

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 15008/PCT ap	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 09808	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 06/10/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 06/10/1999
Anmelder EVOTEC BIOSYSTEMS AG et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1



wie vom Anmelder vorgeschlagen



keine der Abb.



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 B01L3/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 B01L B01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 798 706 A (BRIGATI DAVID J) 17. Januar 1989 (1989-01-17) Spalte 1, Zeile 19 - Spalte 1, Zeile 49 Spalte 2, Zeile 7 - Spalte 2, Zeile 20 Spalte 4, Zeile 14 - Spalte 4, Zeile 23 Spalte 4, Zeile 38 - Spalte 4, Zeile 59	1-3, 6, 8, 9, 12, 16
Y	Spalte 5, Zeile 7 - Spalte 5, Zeile 15 Spalte 5, Zeile 41 - Spalte 6, Zeile 10 Abbildungen 1-3 --- -/--	1-4, 7-10, 12-14, 16



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15/12/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Koch, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 738 825 A (PFEFFERKORN ROLAND ET AL) 14. April 1998 (1998-04-14) Spalte 2, Zeile 11 - Spalte 2, Zeile 44 Spalte 2, Zeile 63 - Spalte 2, Zeile 65 Spalte 4, Zeile 14 - Spalte 4, Zeile 28 Spalte 4, Zeile 35 - Spalte 4, Zeile 67 Spalte 5, Zeile 23 - Spalte 5, Zeile 34	1-3,8,9, 12,14,16
A	Spalte 5, Zeile 41 - Spalte 5, Zeile 54 Spalte 6, Zeile 41 - Spalte 6, Zeile 55 Spalte 8, Zeile 25 - Spalte 8, Zeile 32 Abbildungen 1-6 ---	13
Y	US 5 487 872 A (HAFEMAN DEAN G ET AL) 30. Januar 1996 (1996-01-30) Spalte 1, Zeile 55 - Spalte 2, Zeile 29 Spalte 3, Zeile 6 - Spalte 3, Zeile 27 Spalte 3, Zeile 59 - Spalte 4, Zeile 20 Abbildungen 1-3 ---	7
Y	US 5 681 741 A (ATWOOD JOHN G ET AL) 28. Oktober 1997 (1997-10-28) Spalte 7, Zeile 66 - Spalte 9, Zeile 19 Spalte 18, Zeile 41 - Spalte 18, Zeile 58 Spalte 19, Zeile 14 - Spalte 20, Zeile 55 Spalte 23, Zeile 52 - Spalte 24, Zeile 50 Abbildungen 1-5,26-36 ---	4,7,10, 13
Y	WO 86 06488 A (HICHEM DIAGNOSTICS INC DBA BUR) 6. November 1986 (1986-11-06) Seite 6, Absatz 1 Seite 6, Absatz 4 Seite 7, Absätze 2-4 Seite 10, Absatz 1 Seite 10, Absatz 3 - Seite 11, Zeile 8 Abbildungen 1-6 ---	10,12
P,A	EP 0 983 795 A (HITACHI SOFTWARE ENG) 8. März 2000 (2000-03-08) Spalte 1, Zeile 56 - Spalte 2, Zeile 24 Spalte 3, Zeile 38 - Spalte 4, Zeile 30 Spalte 4, Zeile 47 - Spalte 4, Zeile 49 Spalte 5, Zeile 18 - Spalte 5, Zeile 48 Abbildungen 1-9 -----	1-3,6,8, 9,11,12, 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP00/09808

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4798706 A	17-01-1989	US 4731335 A CA 1302969 A DE 3630866 A GB 2180647 A, B JP 1804588 C JP 5011857 B JP 62098231 A JP 1932910 C JP 5240748 A JP 6070603 B US 4801431 A US 4777020 A US 5023187 A	15-03-1988 09-06-1992 26-03-1987 01-04-1987 26-11-1993 16-02-1993 07-05-1987 26-05-1995 17-09-1993 07-09-1994 31-01-1989 11-10-1988 11-06-1991
US 5738825 A	14-04-1998	DE 69420375 D DE 69420375 T EP 0660924 A JP 8504955 T WO 9503538 A	07-10-1999 18-05-2000 05-07-1995 28-05-1996 02-02-1995
US 5487872 A	30-01-1996	NONE	
US 5681741 A	28-10-1997	US 5364790 A US 5527510 A US 5675700 A AT 177024 T AU 673397 B AU 5505494 A AU 705036 B AU 6219496 A CA 2106360 A CN 1095759 A DE 69323720 D DE 69323720 T DK 611598 T EP 0611598 A EP 0884394 A IL 107131 A IL 120847 A JP 6245771 A NZ 248835 A	15-11-1994 18-06-1996 07-10-1997 15-03-1999 07-11-1996 18-08-1994 13-05-1999 21-11-1996 17-08-1994 30-11-1994 08-04-1999 01-07-1999 27-09-1999 24-08-1994 16-12-1998 30-09-1997 22-09-1999 06-09-1994 21-12-1995
WO 8606488 A	06-11-1986	EP 0221105 A	13-05-1987
EP 0983795 A	08-03-2000	JP 2000078998 A US 6071702 A	21-03-2000 06-06-2000

<p>(51) International Patent Classification⁴ : G01N 33/53, 33/543, 33/544 C12Q 1/00, C12M 1/16, 1/18 C12M 1/20, 1/26, 1/32 C12M 1/40, 1/28, B01L 3/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) International Publication Number: WO 86/ 06488</p> <p>(43) International Publication Date: 6 November 1986 (06.11.86)</p>	
<p>(21) International Application Number: PCT/US86/00709</p> <p>(22) International Filing Date: 10 April 1986 (10.04.86)</p>		<p>(74) Agents: SZEKERES, Gabor, L. et al.; Klein & Szekeres, 4650 Von Karman Avenue, Newport Beach, CA 92660 (US).</p>	
<p>(31) Priority Application Numbers: 728,255 763,332</p> <p>(32) Priority Dates: 29 April 1985 (29.04.85) 6 August 1985 (06.08.85)</p>		<p>(81) Designated States: AT (European patent), BE (European patent), CH (European patent), DE (European patent), FR (European patent), GB (European patent), IT (European patent), LU (European patent), NL (European patent), SE (European patent).</p>	
<p>(33) Priority Country: US</p>		<p>Published <i>With international search report.</i></p>	
<p>(71) Applicant: HICHEM DIAGNOSTICS, INC., DBA BURAL TECHNOLOGIES [US/US]; 1240A Pioneer, Brea, CA 92621 (US).</p>			
<p>(72) Inventor: BARNETT, Burton ; 12592 Martha Ann Drive, Rossmoor, CA 90720 (US).</p>			

A test apparatus for facilitating the performance of chemical, clinical diagnostic, immunoassay and like test. The apparatus includes a housing (22) and a sample receiving area or well (32) defined in the housing and adapted for receiving a sample or specimen. A plurality of rupturable containers (36) are mounted in recesses (34) formed in the housing. Each rupturable container contains the necessary quantity of the specific reagent (38) required for the test. A duct or channel (44) fluidly connects each recess (34) with the sample receiving area or well (32). A sharp spike, or member with a sharp edge (46) is provided in the housing in operative association with each rupturable container (36) to permit an operator to rupture the containers (36) in the sequence required for the test, and thereby to cause the liquid reagents (38) to flow to the sample receiving area or well (32).

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	GA	Gabon	MR	Mauritania
AU	Australia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BB	Barbados	HU	Hungary	NL	Netherlands
BE	Belgium	IT	Italy	NO	Norway
BG	Bulgaria	JP	Japan	RO	Romania
BR	Brazil	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CH	Switzerland	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	TD	Chad
DE	Germany, Federal Republic of	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Denmark	MG	Madagascar	US	United States of America
FI	Finland	ML	Mali		
FR	France				

DIAGNOSTIC TEST KIT

BACKGROUND OF THE INVENTION1. Cross-Reference to Related Application

The present application is a continuation-in-part of application Serial Number 728,255, filed on April 29, 1985 in the United States Patent Office.

2. Technical Field

The present invention is in the field of diagnostic kits and devices. More particularly, the present invention is directed to an apparatus or device which contains the necessary reagents for the performance of diagnostic, immunoassay, and like tests on a sample or specimen, and which facilitates the performance of such tests.

3. Technical Background

Numerous diagnostic, immunoassay, and like tests are commonly used in the clinical diagnostic and related fields. In most tests, a sample or specimen is treated sequentially with predetermined quantities of different reagents. Often, the sample must be incubated with a given reagent for predetermined periods of time before the next reagent is added. Many immunoassay tests utilize an antibody bound to a solid medium. Usually, in such immunoassay tests several "washing" or "rinsing" steps are required to remove excess reagents which are not bound to the antibody.

Positive results of diagnostic immunoassay and like tests are usually indicated by visually perceptible changes, such as color changes, which occur in the treated sample or specimen in the final steps of the tests. As is well known, commonly used clinical diagnostic, immunoassay, and like tests usually test the blood, urine, or other body fluids or tissues, for the presence of certain chemicals, hormones, antigens, pathogens, or abnormal cells.

-2-

In some clinical diagnostic, immunoassay, or like tests, a mere "positive" or "negative" evaluation of the sample or specimen is desired with reference to the presence or absence of the chemical, hormone, antigen, or pathogen which is evaluated by the test. In many other clinical diagnostic tests, a quantitative evaluation of the sample or specimen is made with regard to the level of chemical, hormone, antigen, or pathogen. The quantitative evaluation is often made by spectrophotometric measurement of the color intensity, and/or of other physical property or properties of the sample or specimen.

As is well known by those skilled in the art, many clinical diagnostic laboratories employ numerous skilled technicians to perform, on a daily basis, a very large number of diagnostic, immunoassay, and like tests of the above-described nature. Although the tests are often "routine", they require precision and accuracy. Under the present economic conditions existing in the United States of America, and in most parts of the industrialized world, the skilled laboratory technicians' labor usually contributes a very significant portion to the total cost of "routine" medical diagnostic tests.

In light of the foregoing, many efforts were made in the prior art to provide test kits and devices which strive to simplify "routine" clinical diagnostic, immunoassay, and like tests, facilitate their performance in terms of ease of manipulation of laboratory equipment, and reduce the possibility of human error in the performance of the tests. The apparatus or device of the present invention represents a significant advance over the prior art with regard to the above.

SUMMARY OF THE INVENTION

It is an object of the present invention to provide a diagnostic test kit apparatus which contains, in a readily usable form, the proper amounts of all, or nearly all, reagents which are necessary for the performance of the test.

-3-

It is another object of the present invention to provide a diagnostic test kit apparatus which renders performance of multi-step diagnostic tests relatively simple, and reduces the possibility for human error in the performance of the tests.

It is still another object of the present invention to provide a diagnostic test kit apparatus for the performance of immunoassay tests using an antibody bound on a solid phase, which meets the above-noted objectives and contains the solid phase bound antibody.

It is yet another object of the present invention to provide a simplified, relatively human error-free process for the performance of multi-step clinical diagnostic, immunoassay, and like tests.

The foregoing and other objects and advantages are attained by a test kit apparatus which includes a housing and a sample receiving area, or well, defined in the housing and adapted for receiving a sample or specimen. At least one, but preferably a plurality of rupturable containers, are mounted in the housing. Each container contains the predetermined amount of one of the specific reagents which are required for the performance of the particular diagnostic or immunoassay test for which the kit is designed.

A duct or channel connects each area below each container with the sample receiving area or well, where the sample or specimen is located. A pointed protrusion, or other like member, preferably integrally molded with the housing, is provided in operative association with each container, to enable a technician operator to rupture the container when addition of the specific reagent is required in the test. The liquid or powder reagent content of each container flows through the respective duct or channel into the sample receiving area or well where the test reactions occur.

In embodiments of the device used for immunoassays utilizing a solid bound antibody, a filter paper or similar member supporting the antibody is disposed in the sample

-4-

receiving area or well. A porous plate is disposed below the antibody supporting member to permit the excess reagents and wash solutions to drain into a liquid absorbing material or into a liquid reservoir space disposed below.

In alternative embodiments, the containers, instead of being ruptured or sheared by an object, may contain a weakened wall section whereby they can be ruptured by application of pressure only.

The features of the present invention can be best understood, together with further objects and advantages, by reference to the following description, taken in connection with the accompanying drawings, wherein like numerals indicate like parts.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a perspective view of a first preferred embodiment of the test kit apparatus of the present invention;

Figure 2 is a partial top view of the first preferred embodiment shown on Figure 1, the view showing a transparent protective cover member covering the top of the embodiment;

Figure 3 is a cross-sectional view taken on lines 3,3 of Figure 1;

Figure 4 is a partial top view of the first preferred embodiment shown on Figure 1, without the transparent protective cover member;

Figure 5 is a partial view of the first preferred embodiment, the view being taken on lines 5,5 of Figure 3;

Figure 6 is a cross-sectional view taken on lines 6,6 of Figure 4;

Figure 7 is a partial cross-sectional view of a second preferred embodiment, the view showing an intact container for a liquid reagent incorporated in the embodiment;

Figure 8 is a partial cross-sectional view of the second preferred embodiment, the view showing the container ruptured by a shearing device incorporated in the embodiment;

-5-

Figure 9 is a partial cross-sectional view of a third preferred embodiment, the view showing an intact container for a liquid reagent incorporated in the embodiment;

Figure 10 is a perspective view of a plastic or like sheet to which plastic bubble containers for liquid reagents are affixed in accordance with the present invention;

Figure 11 is a partial perspective view of a fourth preferred embodiment;

Figure 12 is a partial top view of the fourth preferred embodiment;

Figure 13 is a perspective view of a fifth preferred embodiment;

Figure 14 is a partial top view of a sixth preferred embodiment;

Figure 15 is a cross-sectional view of a seventh preferred embodiment;

Figure 16 is a partial top view of an eighth preferred embodiment;

Figure 17 is a partial top view of a ninth preferred embodiment, and

Figure 18 is a partial top view of a tenth preferred embodiment.

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENT

The following specification, taken in connection with the drawings, sets forth the preferred embodiments of the present invention. The embodiments of the invention disclosed herein are the best modes contemplated by the inventor for carrying out his invention in a commercial environment, although it should be understood that various modifications can be accomplished within the scope of the present invention.

Referring now to Figures 1-6 of the appended drawings, the first preferred embodiment 20 of the diagnostic test apparatus of the present invention is disclosed. It should be noted at the outset that the present invention is generally and broadly directed to test kits or apparatus

-6-

which can be adapted to a large variety of chemical, clinical diagnostic, immunoassay, and like tests. The invention is not limited by the type of the test performed in the apparatus. The specific examples of diagnostic or immunoassay tests which are made in the present description should, therefore, be considered exemplary, rather than limiting in nature.

The test apparatus or kit of the present invention includes a housing 22 wherein, in accordance with the present invention, all, or nearly all, reagents required for performing the test are contained in the specific amounts required in the test. The housing 22 is preferably made of molded plastic and comprises a bottom plate 24, an upper plate 26, and an intermediary member 28, best shown on the cross-sectional views of Figures 3 and 6. The foregoing component parts of the housing 22 are preferably attached to one another by sonic welding, gluing, or the like processes which readily adapt themselves to mass manufacturing.

A portion of the top surface of the upper plate 26 of the housing 22 preferably carries indicia 30 providing step-by-step directions for performing the specific test. It should be understood that the indicia 30, that is, the directions for performing the specific test, depend on the nature of the test. The indicia or directions 30 are only schematically shown on Figure 1.

The housing 22 defines a first sample receiving area 32 and a plurality of additional areas 34 for receiving a plurality of small containers 36 which contain the liquid reagents 38 required for the test. More specifically stated, and with reference to Figures 1-6 of the appended drawings, the sample receiving area 32 is a well, formed in the intermediate member 28 of the housing 22, and the additional areas 34 each comprise an additional, although preferably smaller, well or depression also formed in the intermediate member 28 in the housing 22.

In some embodiments (not shown) of the present invention, there may be only one additional area for

-7-

receiving only a single container for a liquid or powdery reagent. Such an embodiment is, of course, preferably used in a test where only a single reagent is required.

Returning now to the description of the first preferred embodiment 20, the sample receiving area or well 32 is located below an opening 40 in the upper plate 26. Moreover, each of the additional wells or depressions 34 in the intermediate member 28 are located below respective openings 42 in the upper plate 26.

Each of the wells or depressions 34 are connected to the main, sample receiving well 32 by a duct or channel 44 so that liquid or powdery reagents can flow from the wells or depressions 34 to the main sample receiving well 32. As is apparent from the drawings, the ducts or channels 44 are integrally molded with the intermediate member 28 of the housing 22, and comprise only a small volume relative to the liquid capacity of either the small containers 36 or of the main sample receiving well 32.

A sharp protrusion or spike 46 is located substantially in the center of each well or depression 34. In the herein-described specific embodiments, the spikes 46 are integrally molded with the intermediate member 28 of the housing 22. Each container 36 comprises a sealed plastic bubble. Each bubble 36 contains the predetermined amount of one of the specific liquid reagents 38 required in the specific diagnostic, immunoassay, or like test for which the test kit is designed. Each plastic bubble 36 is located substantially below the respective opening 42 in the upper plate 26 of the housing 22, and above the respective spike 46 of the corresponding well 34.

Preferably, as in the herein-described preferred embodiment 20, the plastic bubbles 36 are affixed to a substantially flat plastic sheet 48, which is shown in the cross-sectional views of the drawing Figures, and also on Figure 10. For convenience and ease of manufacture, the plastic bubbles 36 are preferably formed in a film of plastic 49, and the plastic sheet 48 serves as their closure. The

-8-

plastic sheet 48 has a cut off corner 50 which serves, together with a matching shoulder (not shown) in the housing 22, as a key during assembly of the test kit. This assures that the plastic sheet 48, bearing the plastic bubbles 36, can be properly mounted in the housing 22 in only one orientation.

Indicia 52, such as the arabic numerals 1, 2, 3, and 4, are located adjacent to each of the openings 42 below which the plastic bubble containers 36 are disposed. These indicia or numerals 52 identify the specific liquid reagent 38 contained therein. The numerals 52, together with the directions 30 (and possibly in combination with other instructions regarding the specific test to be performed), provide the information on the basis of which even a semi-skilled technician (not shown) is able to perform the specific chemical, diagnostic, or immunoassay test for which the particular test apparatus is specifically designed.

Thus, in order to perform the test, an operator technician (not shown) places the sample or specimen 54 in the sample receiving well 32. As it will be readily understood by those skilled in the art, the sample 54 may be a liquid, such as a body fluid, blood, blood serum, or urine. In other than medical diagnostic tests, the sample 54 may be some other liquid, such as water, as, for example, in tests designed for drinking water, swimming pool water, or the like. The sample or specimen 54 may also be solid or semi-solid material, such as a tissue sample which is required in many diagnostic or pathology laboratory tests. The sample 54 may also be a soil sample for soil analysis.

In the event the test apparatus is designed for an immunoassay test using a solid phase bound antibody (not shown) of the type where a component of the sample or specimen binds to the antibody, where reagents are sequentially added to the solid phase for additional binding, and where excess reagents are "rinsed" away from the solid phase, then the apparatus of the present invention also includes the solid phase bound antibody (not shown).

-9-

More specifically, and with reference to Figure 6 showing the first specific embodiment 20 in cross-section, a porous plate 56 is located below the main sample receiving well 32, and a liquid absorbing material 58 is located below the porous plate 56 in the housing 22 just above the bottom plate 24. The porous plate 56 is of the type which permits slow drainage of liquid, and may be made of materials commonly used for this purpose in the laboratory equipment and related arts. The liquid absorbing material 58 preferably comprises cellulose, the exact nature of the absorbant material 58, as well as of the porous plate 56, not being critical for the purposes of the present invention. The total amount of the absorbant material or absorbant padding 58 is, however, such that it is capable of absorbing all, or virtually all, liquid reagent 38 which gradually drains through the porous plate 56.

Referring still particularly to the cross-sectional view of Figure 6, a filter paper or filter membrane 60 is shown disposed above the porous plate 56. The filter paper or membrane 60 comprises the bottom of the main sample receiving area or well 32. For immunoassay tests of the above-specified type, the filter paper or membrane 60 contains the bound antibody which is required in the specific test.

The performance of the specific steps of an immunoassay or like test using the apparatus of the present invention should be readily apparent in light of the foregoing description. After the sample or specimen 54 is placed on the filter paper or membrane 60 in the main well 32, the technician operator (not shown) waits the requisite amount of time (if such time is necessary) to permit binding of the sought-after component (not shown) to occur to the solid supported antibody (not shown). Preferably, the sequence of steps to be followed, including waiting periods between the successive steps, are described in the directions contained in the indicia 30.

-10-

As the directions 30 call for successive addition of specific reagents 38, or rinse solutions, the technician operator (not shown) presses, through the respective opening 42 in the housing 22, the specifically identified plastic bubble container 36 against the spike 46. This action ruptures the plastic sheet 48 that forms the closure of the plastic bubble container 36 and releases its liquid reagent 38. The liquid reagent or rinse solution 38 flows through the narrow duct or channel 44 into the main sample receiving area or well 32, where the requisite chemical or immunological reaction may occur within the pores of the filter paper or membrane 60. Excess reagent or rinse solution 38 gradually drains through the porous plate 56 into the absorbant padding 58 below. In this regard it is noted that virtually the entire reagent 38 content of the plastic bubble or container 36 is forced to flow to the main sample receiving well 32 when the operator (not shown) manually presses the plastic bubble 36. The plastic sheet 48, which forms the closure of the plastic bubble container 36, comprises the upper closure for the ducts 44. This is best shown on the cross-sectional view of Figure 6.

The progress of the test, as well as the final color or other visually perceptible change indicating the outcome of the test, is observed through the opening 40 located above the main sample receiving well 32.

Figures 1 and 2 show a protective plastic cover 62 disposed on the top surface of the upper plate 26 of the housing 22. The protective plastic cover 62 is an optional component of the apparatus of the invention. It protects the plastic bubble containers 36 from accidental rupture, either by a sharp external object, or through inadvertently pressing against the spikes 46, during shipping and handling. The protective cover 62 may carry the indicia 30. The protective cover 62 is preferably transparent, and is preferably affixed to the housing 22 with a pressure sensitive adhesive (not shown) which permits its removal by peeling. Figure 2 shows a separate portion 64 of the protective sheet 62, which can

-11-

be replaced on the housing 22 after the sample or specimen 54 has been added. This permits agitation of the sample with the reagents or rinse solutions in the main sample receiving well 32, by mild shaking, rocking, or the like. In certain tests this may be desirable. It is noted that, unless a distinction is necessary and is made in the present description, the terms "reagents" and "rinse or wash solutions" are used interchangeably.

Referring now to Figures 7 and 8, a second preferred embodiment 66 of the test apparatus of the present invention is disclosed. The second preferred embodiment 66 differs principally from the first preferred embodiment 20 in the manner the plastic bubble containers 36 are ruptured to release their respective liquid reagent 38 contents. As is shown in Figures 7 and 8, in the second preferred embodiment 66 each plastic bubble container 36 incorporates a relatively narrow section 68. The narrow section 68 is disposed below a vertically movable member or plug 70 placed in a substantially vertically formed bore 71 in the housing 22. When it is desired to rupture the plastic bubble container 36, the plug 70 is pressed downwardly to shear off the narrow section 68. A circumferential groove or notch 72 in the plug 70 permits the liquid reagent to flow around the plug 70 through the respective duct 44, to the main sample receiving well 32.

Figure 9 shows a third preferred embodiment 74 of the test apparatus of the present invention. In this embodiment, the plastic bubble containers 36 include a weakened wall section 76 designed to rupture under internal pressure which is attained when the bubble container 36 is finger-pressed by a technician-operator (not shown). After the weakened wall section 76 is ruptured, the liquid reagent 38 is released into the main sample receiving well 32, substantially as in the above-described embodiments.

Figures 11 and 12 show a fourth preferred embodiment 78 of the test apparatus of the present invention. This embodiment is primarily designed for use in tests where it is

-12-

desirable to remove the sample or specimen after the test has been completed, for example, for the purposes of conducting spectrophotometric or radiation counting assays. As is shown on Figures 11 and 12, in the fourth preferred embodiment 78, the main sample receiving area or well 32 is located in a tray 80, which is inserted through an appropriate opening 82 into the housing 22. As a further option, the sample receiving well 32 may be divided into sections 84. In certain tests, the specimen may be placed in one or two of the three sections, and a known control or controls may be placed in the remaining section or sections 84. In such cases, the test indicates its own reliability, in that, if the test functions properly, the section or sections containing the controls should exhibit the expected positive or negative results.

Figure 13 shows a fifth preferred embodiment 86 of the test apparatus of the present invention, wherein a liquid sample or specimen 54 may be placed into the sample receiving area or well 32 through an appropriate, substantially horizontally disposed aperture 88 in the housing 22.

Figure 14 shows a sixth preferred embodiment 90. In this embodiment, one or two ducts or channels 44 fluidly interconnect with one another, before they reach the main sample receiving well 32. This embodiment is primarily useful in tests where two reagents 38 must be added substantially simultaneously, and should be well mixed with one another.

Figure 15 shows a seventh preferred embodiment 92. This embodiment 92 differs principally from the above-described embodiments (primarily the first preferred embodiment 20 which was described in detail) in that an empty chamber 94, capable of acting as a liquid reservoir, is located above the bottom plate 24 of the housing 22. The bottom plate 24 is flexible, and has an aperture 96 equipped with a one-way check valve 98 which allows air to exit from the chamber 94 when the flexible bottom plate 24 is compressed. The seventh

-13-

preferred embodiment 92 has no liquid absorbing padding or like material.

Thus, when it is desired to remove a liquid reagent from the sample receiving well 32 through the porous plate 56, an operator (not shown) manually compresses the bottom plate 24, whereby some air is expelled through the check valve 98 from the chamber 94 disposed below the porous plate 56. After the bottom plate 24 is released, the resulting vacuum in the chamber 94 "draws" the liquid reagent from the sample receiving well 32 through the porous plate 56 into the chamber 94. This process may be repeated several times with several liquid reagents, as they are applied one after another during the performance of the diagnostic or like test.

In light of the foregoing, in the seventh preferred embodiment of the device of the present invention, the chamber 94 in the housing 22 acts as a reservoir for used liquid reagents. The above-described feature of the seventh preferred embodiment also permits relatively fast removal of the liquid reagents from the sample receiving well 32.

Referring now to Figure 16, an eighth preferred embodiment 100 of the device of the present invention is disclosed. The eighth preferred embodiment 100 is a variation of the first preferred embodiment 20, and principally differs from the first preferred embodiment only in that a solid reagent 102 is affixed in the sample receiving well 32. The solid reagent 102 is, of course, one of the reagents which is required for the performance of the specific diagnostic or like test for which the specific test apparatus is designed. Those skilled in the art will readily recognize that the solid reagent 102 may be an enzyme, or an antibody, and that, in many instances, enzymes and other protein comprising reagents are more stable in a solid (lyophilized or the like) state than in solution. The solid reagent 102 may be affixed to the sample receiving well 32 as a tablet, as is shown on Figure 16, or may be otherwise deposited in the sample receiving well 32, as, for example,

-14-

in the form of a concentrated solution which is thereafter permitted to dry. As it will be readily recognized by those skilled in the art, in the tablet shown on Figure 16, the "active" solid reagent 102, such as an enzyme or antibody, is likely to be admixed with other inert or auxiliary solid materials, such as stabilizing agents or desiccants.

Referring now to Figures 17 and 18, still further embodiments in the test apparatus of the present invention are shown. In these embodiments, a solid reagent 102 is contained within a plastic bubble 36 which is disposed above one of the wells or depressions 34 formed in the intermediate member 28 of the housing 22. In the embodiment shown on Figure 17, the channel or duct 44 leads from yet another well 34 to the well containing the solid reagent 102. Therefore, when the liquid contents 38 of the plastic bubble 36 are released, the solid reagent 102 becomes exposed to the liquid reagent to be dissolved therein. The freshly created solution is then added to the main sample receiving well 32.

The embodiment shown on Figure 18 is similar to the embodiment shown on Figure 17, with the only substantial difference that liquid reagents are added from two plastic bubbles to the solid reagent 102 encased in a plastic bubble 36. It is noted in this regard that, in accordance with the varying requirements of specific tests in the embodiments shown on Figures 17 and 18, the ducts 44 and the respective plastic bubbles 36 may be formed in such a manner that the liquid reagent enters the plastic bubble which encases the solid reagent 102.

Although the specific chemical, clinical diagnostic, immunoassay, or like tests, to which the apparatus of the present invention may be adapted, constitute merely the application of the present invention, and not a part thereof, the following examples of specific tests, which are per se known in the art, are briefly described to further illuminate and explain the invention.

Thus, the known immunoassay test for human chorionic gonadotropin hormone (HCG) is described in the following

-15-

manner with reference to the first specific embodiment 20 of the test apparatus of the present invention. As is known, HCG is secreted in every increasing amounts by the human placenta after fertilization, so that the test is an indication of pregnancy.

In the test apparatus of the present invention adapted for the HCG test, the filter paper membrane 60 contains, bound to its cellulose fibers, a monoclonal antibody which reacts with and binds to the HCG molecule. The indicia or directions 30 describe the following steps, and the plastic bubble containers 36, sequentially numbered 1 through 4, contain the appropriate, below-described reagents or wash solutions 38.

In the first step of the procedure, a small, predetermined quantity of urine sample (of the human female subject) is placed on the filter paper 60 in the main sample receiving well 32. The urine sample is allowed to completely drain through the filter paper 60 and porous plate 56 into the underlying absorbant material 58. In this step, the HCG content of the urine (if there is any) binds to the monoclonal antibody, and is retained in the filter paper or membrane 60.

In the next step, the plastic bubble 36, identified with the arabic numeral 1, is depressed against the underlying spike 46 so that it ruptures, and its contents flow into the sample receiving well 32. This reagent, in the herein-described test for HCG, contains an antibody chemically linked to an enzyme. The reagent containing the antibody-linked enzyme is allowed to completely drain through the filter paper 60 and porous plate 56 into the absorbant material 58. The antibody binds to the HCG already bound on the filter paper or membrane 60. The enzyme, coupled to the antibody, is capable of causing a color reaction in a subsequent step of the assay. It follows from the foregoing that, if there is no HCG in the urine sample, there is no binding of the antibody-linked enzyme to the filter paper during this step.

-16-

In the next step, the plastic bubble 36, identified with the arabic numeral 2, is ruptured through pressing against the underlying spike 46. The reagent contained in this bubble 36 is a wash solution, such as saline. The wash solution is allowed to drain completely through the filter 60 and porous plate 56. The wash solution washes away any HCG which was not immobilized in the filter 60 by binding to the antibody contained therein. It also washes away any antibody-linked enzyme which was not immobilized by binding to the HCG molecules bound to the antibody immobilized on the filter 60.

In the subsequent step, the plastic bubble 36, identified as number 3, is ruptured to release a "color developer" reagent into the sample receiving well 32. The "color developer" reagent is a mixture of chemicals which react and develop, or change, color under the catalytic activity of the enzyme bound in the filter 60.

After a two-minute waiting period, the plastic bubble 36, identified as number 4, is ruptured to release a wash solution, and to wash away the "color developer" from the filter 60, thereby stopping the color development process. The intensity of color developed in the filter 60 is proportional to the amount of HCG hormone present in the urine sample. Lack of color indicates a negative, "not pregnant" result.

Readily apparent advantages of the test apparatus of the present invention are the simplicity and ease of procedure for performing the above-described, and like, otherwise relatively cumbersome and attention demanding, diagnostic and similar tests.

Another advantage is that the reagents are separated from one another, and not mixed until immediately before the test. In some instances, this is particularly important, as, for example, in the well-known "Trinder methodology" for cholesterol determination. In this methodology, free cholesterol is oxidized in the presence of cholesterol oxidase enzyme to cholesten-3-one with the production of

-17-

hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide reacts, in the presence of peroxidase enzyme, with 4-amino anti-pyrine and phenol to yield a spectrophotometrically measurable colored dye. However, the mixture of 4-amino anti-pyrine and phenol is not stable in aqueous solutions. Therefore, in the prior art, the reagent kits for the Trinder methodology contained lyophilized mixtures of these two reagents, which had to be reconstituted shortly before use.

In a test apparatus adapted in accordance with the present invention for the Trinder methodology, the aqueous solution of phenol is kept in a separate container from the aqueous 4-amino anti-pyrine, whereby the problem of low stability is eliminated, and there is no need for relatively expensive lyophilized reagents.

It will be readily apparent, to those skilled in the art, that several modifications in the construction and application of the test apparatus of the present invention can be made in light of the foregoing disclosure. Therefore, the scope of the present invention should be interpreted solely from the following claims, as such claims are read in light of the disclosure.

-18-

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An apparatus adapted for receiving a sample or specimen on which a chemical or diagnostic test is to be performed, for containing a predetermined amount of at least one liquid reagent which is to be used for performing the test, and for facilitating the addition of the reagent to the sample, the apparatus comprising:

a housing;

a liquid reservoir area defined in the housing and comprising means for receiving the sample or specimen;

at least one container at least partially contained in the housing, the container containing a predetermined amount of the liquid reagent required for performing the test, and having rupturable walls;

means contained in the housing for rupturing the wall of the container, to cause the liquid reagent to escape from the container, and

means connected with the liquid reservoir area for permitting the liquid reagent which has escaped from the container to flow to the liquid reservoir area and to the sample or specimen thereon, whereby the liquid reagent contents of the container is added to the sample or specimen.

2. The apparatus of Claim 1 wherein the container comprises a sealed plastic bubble, and wherein the means for rupturing comprise means included in the housing for piercing the plastic bubble when the bubble is pressed against the means for piercing.

3. The apparatus of Claim 3 wherein the means for rupturing comprise a sharp point included in the housing and disposed substantially below the plastic bubble.

4. The apparatus of Claim 1 wherein the container comprises a sealed plastic bubble, and wherein the means for rupturing comprise a weakened wall section incorporated in the plastic bubble, the weakened wall section being adapted for rupturing under pressure when sufficient pressure is manually applied by an operator against the plastic bubble.

-19-

5. The apparatus of Claim 1 further comprising a sheet of plastic material contained in the housing, and wherein the container comprises a sealed plastic bubble and the bubble is attached to the sheet.

6. The apparatus of Claim 1 wherein the liquid reservoir area is defined by a first depression incorporated in the housing, wherein a further depression is defined by the housing disposed below the container, and wherein the means for permitting comprise a duct incorporated in the housing, said duct establishing fluid communication between the first depression and the depressions disposed below the container.

7. The apparatus of Claim 6 further comprising a sheet of plastic material contained in the housing, and wherein the container comprises a sealed plastic bubble and the bubble is attached to the sheet, and further wherein said duct is formed as an upwardly open channel in the housing, and the sheet comprises an upper closure member for the duct.

8. The apparatus of Claim 1 further comprising a sheet of plastic material contained in the housing, and wherein the container comprises a sealed plastic bubble and the bubble is attached to the sheet in a predetermined geometrical configuration, and further wherein the housing comprises an upper plate and a lower plate, the upper plate having an opening, said opening providing manual access to the plastic bubble, whereby manual pressure may be applied by an operator on the plastic bubble for rupturing the plastic bubble through the means for rupturing.

9. The apparatus of Claim 9 wherein the means for rupturing comprise means included in the housing for piercing the plastic bubble when the bubble is pressed against the means for piercing.

10. An apparatus to be used in connection with the performance of a medical diagnostic test and the like, wherein a sample or specimen is exposed to a plurality of liquid reagents in a predetermined sequence, the apparatus comprising:

-20-

a housing having a bottom plate and a top plate, said plates being assembled to one another and defining an, at least partially, enclosed interior space, the upper plate having a plurality of openings;

a liquid reservoir area defined within the interior space, said liquid reservoir area being included in a depression formed within the housing and being disposed below one of the openings in the upper plate, the depression and the liquid reservoir area being adapted to contain the sample or specimen;

a plurality of recesses defined within the housing, each of said recesses being disposed in the interior space at least partially below one opening in the upper plate;

a plurality of sealed containers having rupturable walls, each of the containers being located above one of the recesses and containing a predetermined amount of liquid reagent which is used in the diagnostic test;

duct means incorporated in the housing for fluidly connecting each of the recesses with the first liquid reservoir area, and

means for selectively rupturing any one of the sealed containers at the option of an operator, whereby the liquid reagent is released from the ruptured container into the corresponding recess and is transferred therefrom to the liquid reservoir area through the duct means so as to expose the sample or specimen to the liquid reagent, and whereby the sample or specimen is exposed to the liquid reagents in the sequence in which the operator causes rupturing of the sealed containers.

11. The apparatus of Claim 10 wherein the sealed containers comprise plastic bubbles.

12. The apparatus of Claim 11 wherein the means for selectively rupturing comprise members integral with the housing disposed in the recesses and having a sharp edge

comprising means for piercing the plastic bubble when the plastic bubble is pressed against the sharp edge.

13. The apparatus of Claim 11 wherein each plastic bubble has a narrow projection, and wherein the means for selectively rupturing comprise means, manually actuable by the operator, for shearing off the narrow projection.

14. The apparatus of Claim 11 wherein the means for selectively rupturing comprise a weakened wall section incorporated in each of the plastic bubbles, the weakened wall section being adapted for rupturing when sufficient manual pressure is exerted on the plastic bubble.

15. The apparatus of Claim 11 further comprising a plastic sheet, the plastic bubbles being fixedly mounted to the plastic sheet in a predetermined configuration.

16. The apparatus of Claim 11 further comprising liquid absorbing means disposed below the liquid reservoir area for at least partially absorbing the liquid reagents used in the test.

17. The apparatus of Claim 16 further comprising a porous plate disposed below the liquid reservoir area and above the liquid absorbing means.

18. The apparatus of Claim 17 further comprising filter paper disposed in the liquid reservoir area above the porous plate.

19. The apparatus of Claim 11 further comprising means for removing by suction liquid reagent from the liquid reservoir area into a waste liquid reservoir space defined in the housing below the liquid reservoir area.

20. The apparatus of Claim 19 wherein the means for removing by suction comprise a flexible, compressible plate incorporated in the housing and valve means for releasing air into the ambient from the waste liquid reservoir space when the flexible plate is compressed.

21. An apparatus to be used in connection with the performance of a medical diagnostic test and the like, wherein a sample or specimen is exposed to a plurality of

-22-

liquid reagents in a pred terminated sequence, the apparatus comprising:

a housing having a bottom plate and a top plate, said plates being assembled to one another and defining an at least partially enclosed interior space, the upper plate having a plurality of openings;

a first depression formed in an interior surface of the housing below a first opening, the first depression forming a liquid reservoir and space for placement of a sample or specimen on which the diagnostic or like test is to be performed;

a plurality of additional depressions formed in the interior surface of the housing, each additional depression being disposed below one of the openings in the upper plate;

a plurality of ducts connecting each additional depression with the liquid reservoir and establishing fluid communication from the respective additional depression to the liquid reservoir;

a plurality of plastic bubbles, each bubble comprising a sealed container for a predetermined amount of liquid reagent which is used in the diagnostic or like test, each bubble being contained at least partially in the housing above one additional depression, and

a plurality of members disposed at least partially in the housing, each member being in operative association with one of the plastic bubbles and comprising means for rupturing the respective plastic bubble, whereby the liquid reagent is released from the plastic bubble and flows into the liquid reservoir to come into contact with the sample or specimen.

22. The apparatus of Claim 21 wherein each member is integrally constructed with the housing and has a sharp projection disposed toward a plastic bubble, each member being located in one of the additional depressions, whereby pressure applied manually against any of the plastic bubbles

-23-

through the respective opening forces the plastic bubble against the sharp projection and pierces the plastic bubble.

23. The apparatus of Claim 22 further comprising liquid absorbing means disposed below the liquid reservoir area for at least partially absorbing the liquid reagents used in the test.

24. The apparatus of Claim 23 further comprising a porous plate disposed below the liquid reservoir area and above the liquid absorbing means.

25. The apparatus of Claim 24 further comprising a filter member disposed in the liquid reservoir area above the porous plate.

26. The apparatus of Claim 25 wherein the filter means contains a bound antibody necessary for the test.

27. The apparatus of Claim 21 further comprising an enclosed waste liquid reservoir space disposed below the liquid reservoir area and means for drawing by suction liquid reagent from the liquid reservoir area into the liquid reservoir space.

28. The apparatus of Claim 27 further comprising a porous plate disposed below the liquid reservoir area and above the waste liquid reservoir space.

29. The apparatus of Claim 28 wherein the means for drawing comprises a flexible compressible plate of the housing and valve means for releasing air from the waste liquid reservoir space when the flexible plate is compressed.

30. The apparatus of Claim 21 comprising a peelable band attached to the top plate of the housing, the peelable band comprising means for preventing access to the plastic bubbles until the peelable band is at least partially removed from the upper plate.

31. The apparatus of Claim 30 wherein the peelable band carries indicia containing instructions for performing the test.

32. A process for performing a diagnostic or like test on a sample or specimen, said test requiring the addition of substantially predetermined volumes of a plurality of liquid

-24-

reagents to the sample or specimen in a predetermined sequence, the process comprising the steps of:

placing the sample or specimen into a liquid reservoir maintained in a housing;

maintaining a predetermined volume of each one of the liquid reagents in a sealed plastic bubble arranged in a predetermined configuration in the housing, said housing or said bubbles having means for rupturing each of the plastic bubbles;

rupturing each of the plastic bubbles in the predetermined sequence required by the diagnostic or like test, and

immediately after each step of rupturing, permitting the predetermined volume of liquid reagent to flow into the liquid reservoir to come into contact with the sample or specimen.

33. The process of Claim 32 wherein each step of rupturing comprises piercing the respective plastic bubble with a sharp object.

34. The process of Claim 33 wherein each step of piercing includes a step of pressing the plastic bubble downwardly against the sharp object which is contained in the housing below the respective plastic bubble.

35. The process of Claim 32 wherein each step of rupturing includes a step of shearing a narrow neck portion of the respective plastic bubble.

36. The process of Claim 32 wherein each step of rupturing includes a step of applying sufficient pressure on the respective plastic bubble to cause internal pressure of the liquid reagent contained in the bubble to rupture a weakened wall section of the bubble.

37. The process of Claim 32 including the additional step of waiting for a predetermined period of time after rupturing at least one of the plastic bubbles.

38. The process of Claim 32 including the additional step of removing by suction the liquid reagent from the

-25-

liquid reservoir after the liquid reagent has come into contact with the sampl or specimen.

39. The process of Claim 38 wherein the step of removing by suction comprises removing the liquid reagent into the interior of the housing.

1 / 3

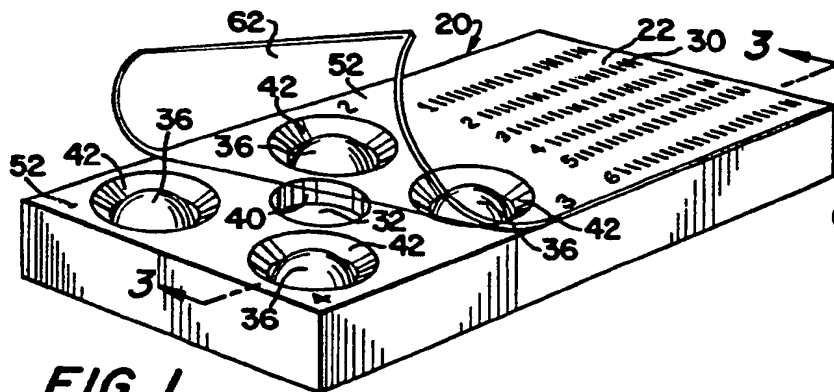


FIG. 1

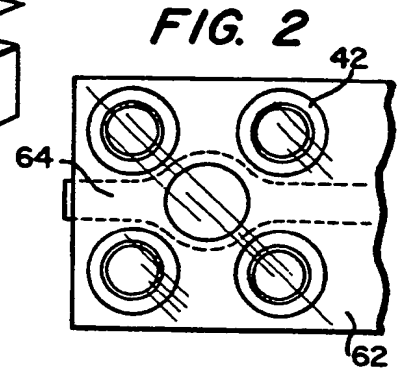


FIG. 2

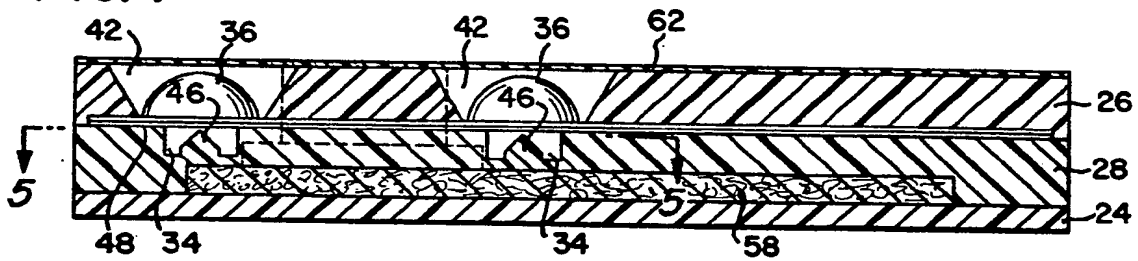


FIG. 3

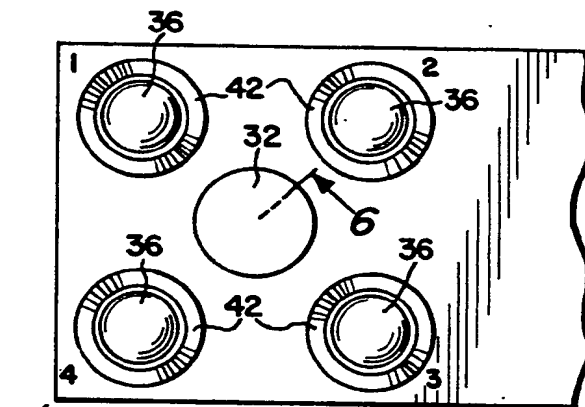


FIG. 4

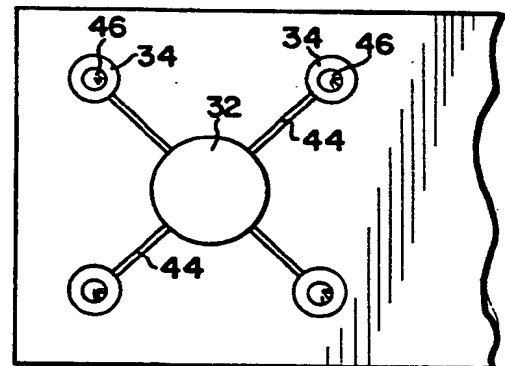


FIG. 5

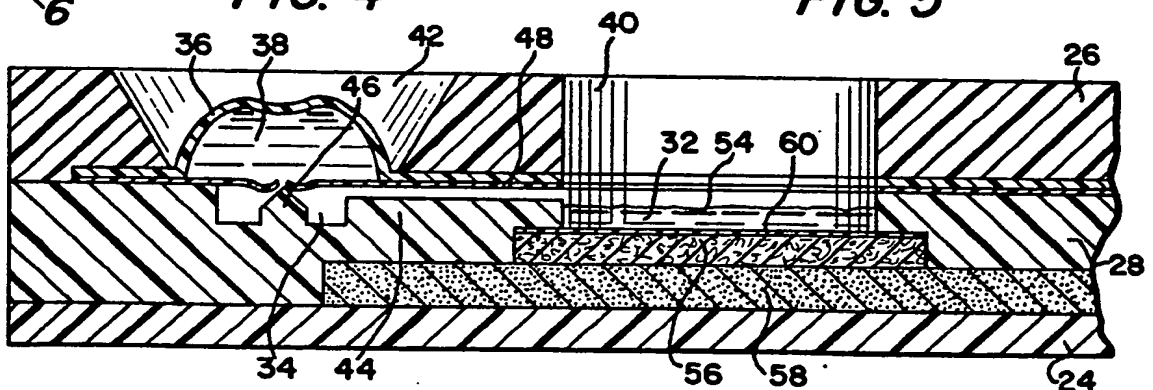


FIG. 6

SUBSTITUTE SHEET

2 / 3

FIG. 7

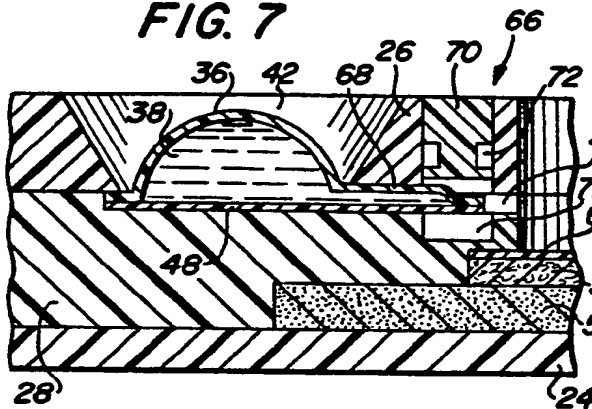


FIG. 8

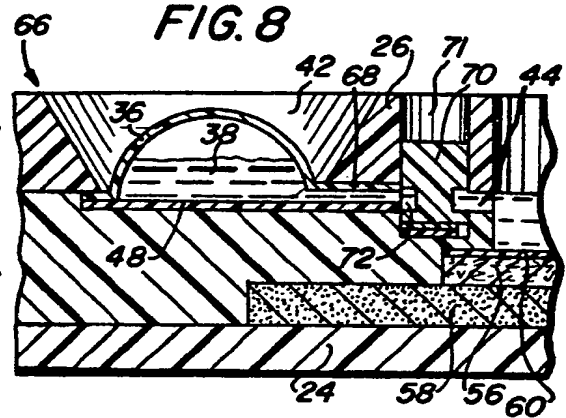


FIG. 9

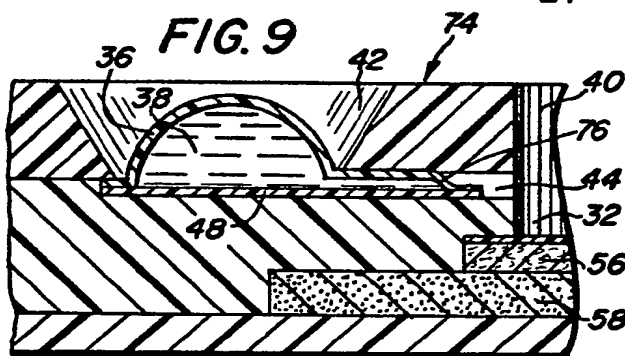


FIG. 10

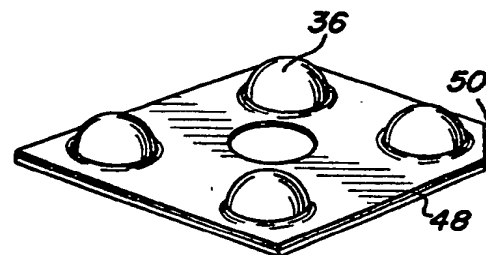


FIG. 11

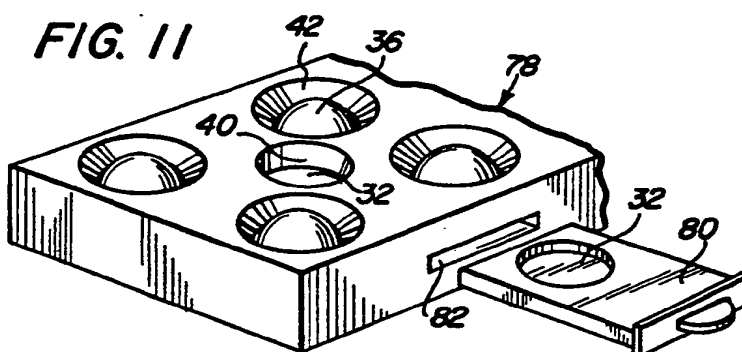


FIG. 12

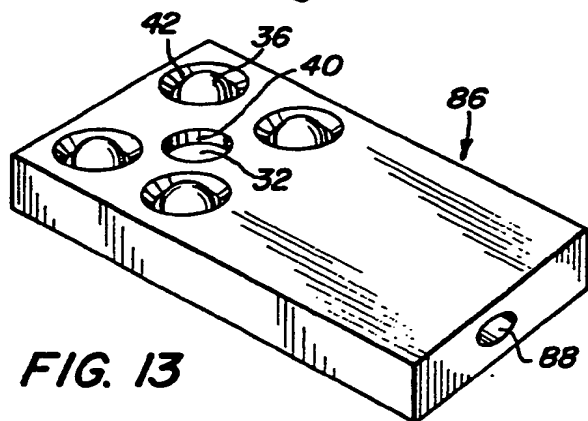
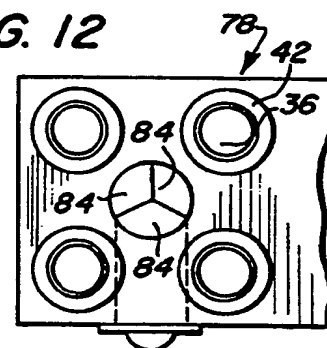
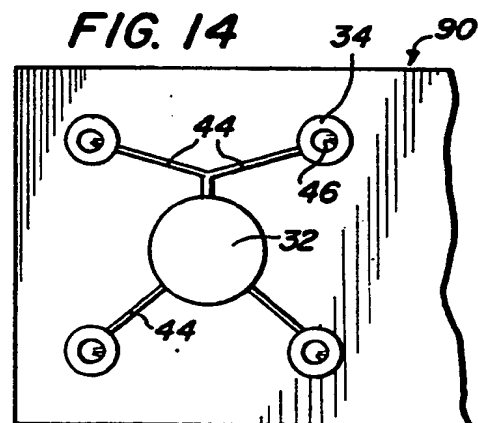


FIG. 13

FIG. 14



SUBSTITUTE SHEET

3 / 3

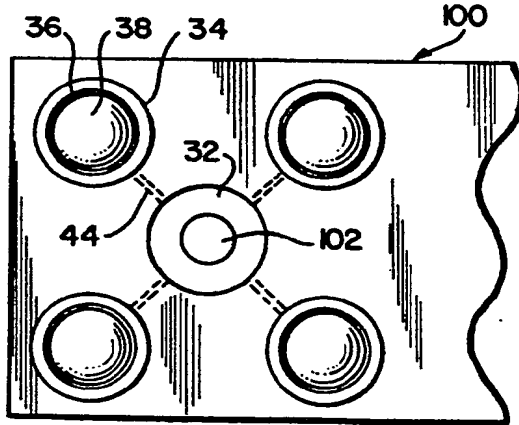
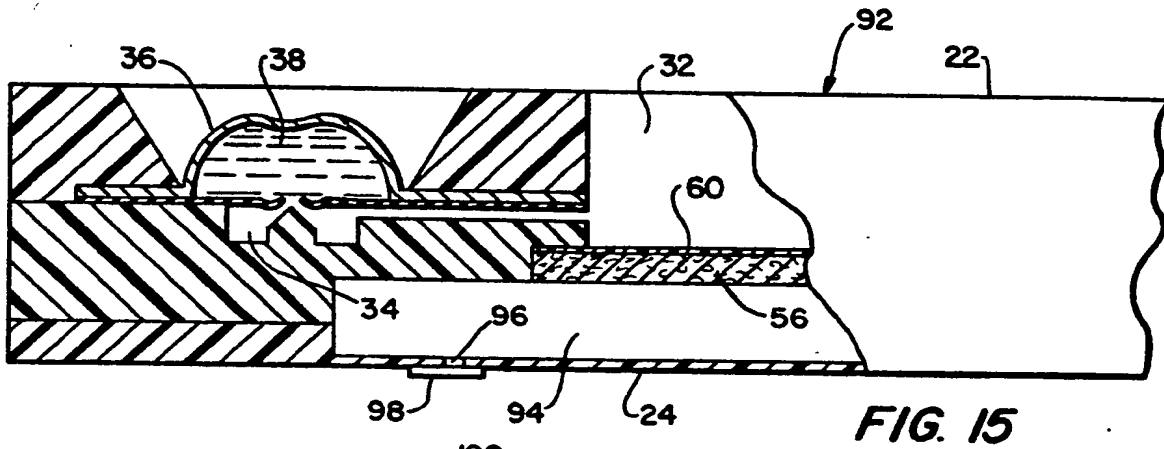


FIG. 17

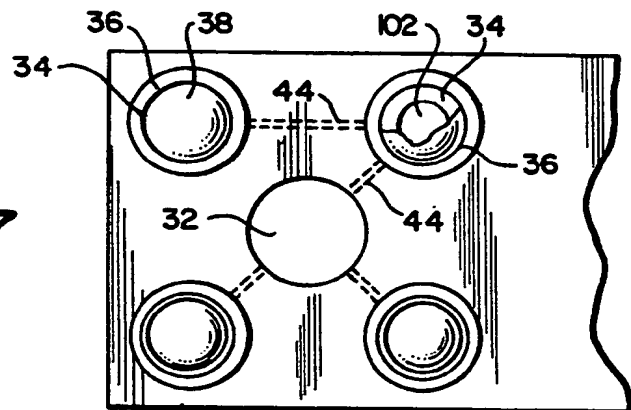
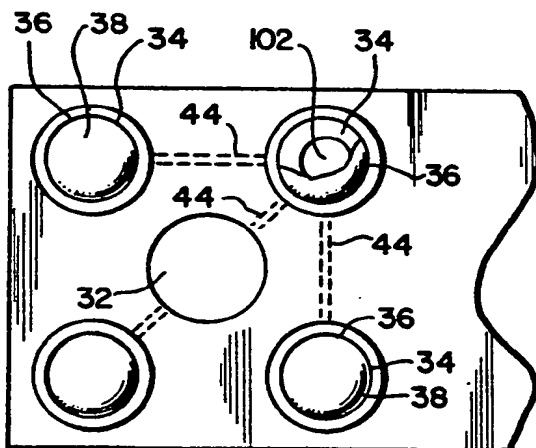


FIG. 18



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US86/00709

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ³ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC U.S. 435/4, 7, 288, 292, 293, 294, 300, 301, 810; (See Attachment) INT. Cl. ⁴ G 01 N 33/53, 33/543, 33/544; C 12 Q 1/00;																				
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Minimum Documentation Searched ⁴</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 20%;">Classification System</th> <th style="width: 80%;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">U.S.</td> <td style="padding: 5px;">435/4, 7, 288, 292, 293, 294, 299, 300, 301, 810 436/518, 528, 530, 535, 808, 809</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵</div> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;">HICHEM DIAGNOSTICS, INC., DBA BURAL TECHNOLOGIES.</p>			Classification System	Classification Symbols	U.S.	435/4, 7, 288, 292, 293, 294, 299, 300, 301, 810 436/518, 528, 530, 535, 808, 809														
Classification System	Classification Symbols																			
U.S.	435/4, 7, 288, 292, 293, 294, 299, 300, 301, 810 436/518, 528, 530, 535, 808, 809																			
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%;">Category ⁶</th> <th style="width: 60%;">Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷</th> <th style="width: 30%;">Relevant to Claim No. ¹⁸</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X Y</td> <td style="padding: 5px;">US, A, 4,324,758 (EISENTRAUT ET AL) 13 April 1982 See column 8, line 26 to column 9, line 13.</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1.4, 6, 10, 11, 14, 32, 36, 37 <u>1-39</u></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X Y</td> <td style="padding: 5px;">US, A, 3,497,320 (BLACKBURN ET AL) 24 February 1970 See column 5, line 69 to column 7, line 11.</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1.4-7, 32, 36 <u>1-39</u></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td style="padding: 5px;">US, A, 3,689,224 (AGNEW ET AL) 05 September 1972 See column 4, lines 63 to 68.</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1.4, 5, 6</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td style="padding: 5px;">US, A, 3,476,515 (JOHNSON ET AL) 04 November 1969 See column 1, lines 15 to 26.</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1, 4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">Y</td> <td style="padding: 5px;">US, A, 3,888,629 (BAGSHAWE) 10 June 1975 See column 1, line 26 to 43.</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">16-19, 23- 28, 38, 39</td> </tr> </table>			Category ⁶	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸	X Y	US, A, 4,324,758 (EISENTRAUT ET AL) 13 April 1982 See column 8, line 26 to column 9, line 13.	1.4, 6, 10, 11, 14, 32, 36, 37 <u>1-39</u>	X Y	US, A, 3,497,320 (BLACKBURN ET AL) 24 February 1970 See column 5, line 69 to column 7, line 11.	1.4-7, 32, 36 <u>1-39</u>	X	US, A, 3,689,224 (AGNEW ET AL) 05 September 1972 See column 4, lines 63 to 68.	1.4, 5, 6	X	US, A, 3,476,515 (JOHNSON ET AL) 04 November 1969 See column 1, lines 15 to 26.	1, 4	Y	US, A, 3,888,629 (BAGSHAWE) 10 June 1975 See column 1, line 26 to 43.	16-19, 23- 28, 38, 39
Category ⁶	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸																		
X Y	US, A, 4,324,758 (EISENTRAUT ET AL) 13 April 1982 See column 8, line 26 to column 9, line 13.	1.4, 6, 10, 11, 14, 32, 36, 37 <u>1-39</u>																		
X Y	US, A, 3,497,320 (BLACKBURN ET AL) 24 February 1970 See column 5, line 69 to column 7, line 11.	1.4-7, 32, 36 <u>1-39</u>																		
X	US, A, 3,689,224 (AGNEW ET AL) 05 September 1972 See column 4, lines 63 to 68.	1.4, 5, 6																		
X	US, A, 3,476,515 (JOHNSON ET AL) 04 November 1969 See column 1, lines 15 to 26.	1, 4																		
Y	US, A, 3,888,629 (BAGSHAWE) 10 June 1975 See column 1, line 26 to 43.	16-19, 23- 28, 38, 39																		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁵ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>																				
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search ¹ 09 JUNE 1986 </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report ² <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">26 JUN 1986</div> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> International Searching Authority ¹ ISA/US </td> <td style="padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer ²⁰ Randall E. Deck </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search ¹ 09 JUNE 1986	Date of Mailing of this International Search Report ² <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">26 JUN 1986</div>	International Searching Authority ¹ ISA/US	Signature of Authorized Officer ²⁰ Randall E. Deck														
Date of the Actual Completion of the International Search ¹ 09 JUNE 1986	Date of Mailing of this International Search Report ² <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">26 JUN 1986</div>																			
International Searching Authority ¹ ISA/US	Signature of Authorized Officer ²⁰ Randall E. Deck																			

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

Y	US, A, 4,246,339 (COLE ET AL) 20 January 1981 See column 1, line 52 to column 2, line 35.	16-19.23-28.38.39
Y	US, A, 4,428,907 (HEIJENGA ET AL) 31 January 1984 See column 4, line 67 to column 5, line 5.	2,3,9.12.13,21.22.33-35

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹⁰

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers _____, because they relate to subject matter ¹² not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim numbers _____, because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out ¹³, specifically:

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ¹¹

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No ¹⁸
Y	US,A, 3,799,742 (COLEMAN) 26 MARCH 1974, See column 13, lines 32 to 39.	2,3,9,12, 13,21,22, 33-35
Y	US,A, 3,768,974 (STORM) 30 October 1973 See column 1, line 60 to column 2, line 11	19,20,27-29,38,39
Y	US,A, 3,740,196 (STOTERHOFF) 19 June 1973 See column 3, lines 9 to 11.	30,31
A	US,A, 4,090,850 (CHEN ET AL) 23 May 1978.	19,27,28, 38,39
A	US,A, 4,407,943 (COLE ET AL) 04 October 1983.	19,27,28, 38,39
A	US,A, 4,458,020 (BOHN ET AL) 03 July 1984.	1-39
A	WO,A1, 8202211 (CHANDLER ET AL) 08 July 1982.	1-39
A	DE,A, 2,028,822 (KELLER) 16 December 1971.	1-39

PCT/US86/00709

I. Classification of Subject Matter (continued)

U.S. 436/518, 528, 530, 535, 808, 809
422/56, 58, 60, 61, 99, 102
206/569, 305
435/299

INT. Cl. 4
Cl2M 1/16, 1/18, 1/20, 1/26, 1/32, 1/40, 1/28
B01L 3/00

II. Fields Searched

422/56, 58, 60, 61, 99, 102; 206/569, 305

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 983 795 A2

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

(43) Date of publication:

08.03.2000 Bulletin 2000/10

(51) Int. Cl.⁷: **B01L 3/00**

(21) Application number: **99250258.3**

(22) Date of filing: **30.07.1999**

(84) Designated Contracting States:

**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**

Designated Extension States:

AL LT LV MK RO SI

(30) Priority: **04.09.1998 JP 25089798**

(71) Applicant:

**Hitachi Software Engineering Co., Ltd.
Yokohama-shi, Kanagawa 231-8475 (JP)**

(72) Inventors:

- **Yamamoto, Kenji,
Hitachi Software Engin. Co., Ltd.
Yokohama-shi, Kanagawa 231-8475 (JP)**

• **Yurino, Noriko,**

**Hitachi Software Engin. Co., Ltd.
Yokohama-shi, Kanagawa 231-8475 (JP)**

• **Nasu, Hisanori,**

**Hitachi Software Engin. Co., Ltd.
Yokohama-shi, Kanagawa 231-8475 (JP)**

(74) Representative:

**Hengelhaupt, Jürgen, Dipl.-Ing. et al
Patentanwälte
Gulde Hengelhaupt Ziebig,
Lützowplatz 11-13
10785 Berlin (DE)**

(54) **Probe bearing element and method for producing the same**

(57) A probe-bearing element according to the present invention includes a sheet-like body having a plurality of through holes which each bears a biopolymer probe. The sheet-like body may have a thickness of 100 μ m to 2 mm, and may be made of glass, acrylic resin, metal or plastic. Preferably, the size of the through hole is about 10-100 μ m in diameter considering the number of samples relative to the size of the element, amounts of probes required for hybridization and the detection sensitivity. The plurality of through holes are preferably arranged in concentric circles or in a spiral.

EP 0 983 795 A2

Description

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention relates to a probe-bearing element that bears probes for detecting DNA or protein in a sample through hybridization reaction, and to a method for producing the probe-bearing element.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] In the fields of molecular biology and biochemistry, biopolymers such as nucleic acids and proteins from organisms are identified and fractionated in order to search useful genes or to diagnose diseases. As a pre-treatment of such identification and fractionation, a hybridization reaction is often employed in which a target molecule in a sample is hybridized with a nucleic acid or a protein of a known sequence. For this purpose, a probe-bearing element known as a biochip, a DNA disc or the like is used which bears probes such as DNA, RNA, protein and the like with known sequences at predetermined positions.

[0003] The probe-bearing element is provided with a plurality of features that are bound with diverse probes, respectively. The probe-bearing element is placed in a reaction vessel called a chamber together with sample DNA such that the sample DNA labeled with fluorescence hybridizes with the probes bound to the features of the probe-bearing element. Then, the probe-bearing element is irradiated with excitation light, thereby detecting fluorescence intensity at each feature to determine an amount of binding between each probe and the sample DNA. The results can be used as advantageous information.

[0004] Conventionally, as described in US Patent No. 5,445,934, a probe-bearing element is generally produced one by one at a time by synthesizing a protein or a DNA probe of interest on a feature of the probe-bearing element. Such conventional method is troublesome and time-consuming, and thus increases the cost of the probe-bearing element. As a result, probe-bearing elements are unsuitable to be generally used in, for example, hospitals for diagnosing genetic diseases. Moreover, since the synthesis has limitation in producing long probes, the types of DNA used as probes are also limited.

[0005] The present invention was accomplished in view of the above problems, and aims at providing a probe-bearing element which can be mass produced and which has a stable quality, and a method for producing the probe-bearing element.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0006] A probe-bearing element according to the present invention includes a sheet-like body having a plurality of through holes which each bears a biopoly-

mer probe. The sheet-like body may have a thickness of 100 μm to 2 mm, and may be made of glass, acrylic resin, metal or plastic. Preferably, the size of the through hole is about 10-100 μm in diameter considering the number of samples relative to the size of the element, amounts of probes required for hybridization and the detection sensitivity. The plurality of through holes are preferably arranged in concentric circles or in a spiral.

[0007] The through holes bear various types of probe, respectively. At least one of the probes may have a length of 200 bases or more. The probe may be DNA, RNA or a protein.

[0008] At least one surface of each of the sheet-like bodies may be applied with an adhesive. It is also possible that neither surface of the sheet-like bodies have an adhesive thereon.

[0009] In one aspect, the present invention is a method for producing a sheet-like probe-bearing element having a plurality of through holes bearing biopolymer probes, including the steps of: piling a plurality of sheet-like bodies; providing a plurality of through holes through the pile of sheet-like bodies; injecting a biopolymer probe into each of the through holes; and separating the sheet-like bodies from each other.

[0010] In another aspect, the present invention is a method for producing a sheet-like probe-bearing element having a plurality of through holes bearing biopolymer probes, including the steps of: providing a plurality of through holes through a block-like material; injecting a biopolymer probe into each of the through holes; and slicing the block-like material into sheets such that every sheet has the plurality of through holes.

[0011] The pile of sheet bodies or the block material may be provided with through holes through laser irradiation. The through holes are preferably pretreated in order to promote binding between the through holes and the probes, before injecting the probes into the through holes. The pretreatment can be conducted by coating the through holes with poly-L-lysine or carbodiimide (Japanese Patent Laid-Open Application No. 8-23975).

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0012]

Figure 1 is a schematic plan view showing an exemplary probe-bearing element according to the present invention;

Figure 2 is a schematic plan view showing another exemplary probe-bearing element according to the present invention;

Figure 3 is a schematic cross-sectional view showing an exemplary probe-bearing element according to the present invention;

Figure 4 is a schematic cross-sectional view showing another exemplary probe-bearing element according to the present invention;

Figure 5 is a perspective view for illustrating one of the steps in the method for producing a probe-bearing element of the present invention;

Figure 6 is a perspective view for illustrating one of the steps in the method for producing the probe-bearing element of the present invention;

Figure 7 is a perspective view for illustrating one of the steps in the method for producing the probe-bearing element of the present invention;

Figure 8 is a perspective view for illustrating one of the steps in the method for producing the probe-bearing element of the present invention;

Figures 9A and 9B are schematic views showing an example of a securing member for securing a plurality of sheets;

Figure 10 is a schematic view showing one of the steps in another exemplary method for producing a probe-bearing element of the invention; and

Figure 11 is a schematic view showing one of the steps in another exemplary method for producing a probe-bearing element of the invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0013] Hereinafter, the present invention will be described in more detail by way of examples with reference to the accompanying drawings.

[0014] Figures 1 and 2 are schematic plan views showing exemplary probe-bearing elements 1 and 2 according to the present invention, respectively. The probe-bearing element 1 shown in Figure 1 has a circular main body 10 with a plurality of through holes 13 arranged in concentric circles. Each of the plurality of through holes 13 bears a biopolymer probe. The probe-bearing element 2 shown in Figure 2 has a circular main body 11 with a plurality of through holes 14 arranged in a spiral. Again, each of the plurality of through holes 14 bears a biopolymer probe. The shape of the probe-bearing element is not limited to circle as shown in Figures 1 and 2, and may be a polygon such as a square or a hexagon.

[0015] Figures 3 and 4 are schematic cross-sectional views showing exemplary probe-bearing elements 3 and 4 according to the present invention, respectively. The probe-bearing element 3 shown in Figure 3 has a sheet-like main body 15 that has a plurality of through holes 16 passing therethrough. The probe-bearing element 4 shown in Figure 4 has a sheet-like body 17 with

a plurality of through holes 18 passing therethrough and has a reinforcement member 19 adhered to the bottom surface of the sheet-like body 17 with, for example, an adhesive.

[0016] The sheet-like bodies 15 and 17 may be made of a material which does not denature at a temperature as high as about 100°C and at a humidity as high as about 100%, for example, glass, metal such as stainless steel or aluminum, plastic such as polycarbonate, polyethylene or polypropylene, an acrylic resin, or the like. The thickness of the sheet-like bodies 15 and 17 is suitably about 100 µm to 2 mm. The reinforcement member 19 is provided for providing physical reinforcement of the sheet-like body 17 and for facilitating the handling of the probe-bearing element 4. The reinforcement member 19 may be a glass plate, a plastic plate, an aluminum plate or the like with a thickness of about 1 mm to 5 mm. The reinforcement member 19 is adhered to the sheet-like body 17 with an adhesive such as an acrylic resin adhesive, an ethylene-vinylacetate adhesive or an elastomer adhesive.

[0017] The size of the through holes 13, 14, 16 and 18 is about 10 µm to 100 µm diameter. Each of the through holes 13, 14, 16 and 18 bears in its interior (inner wall), a probe that is capable of hybridizing with a biopolymer such as DNA, RNA, protein or the like with specific sequences. Whereas the types (lengths) of the probe DNA are limited in a conventional method, the probe-bearing element of the present invention can use any type of DNA as the probe regardless of its length.

[0018] Hereinafter, an exemplary of a method for producing a probe-bearing element of the present invention will be described. In this example, a sheet-like body is made from polypropylene.

[0019] Figure 5 is a perspective view for illustrating one of the steps in the method for producing the probe-bearing element of the present invention. About several tens to several hundreds of polypropylene sheets 22 (thickness: about 100 µm) are piled and adhered to each other with a thin layer of adhesive 21 applied therebetween. The number of the polypropylene sheets 22 is suitably selected depending on a type and an output of laser used for the laser process described later. For example, CO₂ laser with an output of 0.2 kW can cut various types of resin with a thickness of about 3 mm. Thus, this laser can provide a through hole through a maximum of 30 polypropylene sheets at a time. The adhesive is, for example, an elastomer adhesive that easily peels off with external force.

[0020] Figure 6 is a perspective view for illustrating one of the steps in the method for producing the probe-bearing element of the present invention. A plurality of through holes 28 are provided through the pile of sheets 25 by a laser beam 27 radiated from a laser processor 26. The laser processor 26 may employ, for example, ruby laser, neogium glass laser, CO₂ laser or YAG laser. The diameter of each through hole 28 provided with the laser processor 26 is about 10 to 100 µm. The through

holes 28 are arranged in concentric circles or in a spiral as shown in Figures 1 and 2, respectively.

[0021] Then, the pile of polypropylene sheets 25 with the through holes 28 is pretreated in order to promote the binding between the inner walls of the through holes 28 and biopolymer probes to be applied. The pretreatment may be conducted, for example, by coating the inner walls of the through holes 28 with poly-L-lysine or with carbodiimide. Coating with poly-L-lysine is conducted as follows. First, the pile of polypropylene sheets 25 is immersed and shaken in a poly-L-lysine solution at 18-26°C for 5 minutes. Then, the pile of polypropylene sheets 25 is taken out from the poly-L-lysine solution, placed in an oven at 60°C for 1 hour and finally cooled to room temperature. The carbodiimide coating is conducted by immersing and shaking the pile of polypropylene sheets 25 in a carbodiimide solution.

[0022] Thereafter, a biopolymer probe is injected into each through hole 28 of the pile of polypropylene sheets 25 according to any method. For example, probe DNA is drawn in a syringe with a fine needle that can be inserted into the through hole 28 to thereby inject the probe DNA. Alternatively, the probe DNA may be drawn out from the syringe by vacuum suction from the side opposite to the side of inserting the syringe.

[0023] Then, as shown in Figure 7, the pile of polypropylene sheets 25 is cut into a columnar block 30 (Figure 8) with a diameter of about 2 cm using a laser processor, a wire saw or the like. The cutting step shown in Figure 7 may be conducted prior to the step of pretreating the through holes 28 for promoting the binding between the through holes 28 and the biopolymer probes or prior to the step of injecting the probes into the through holes 28.

[0024] Finally, the polypropylene sheets 22 with the biopolymer probes are separated from each other.

[0025] Thus, identical probe-bearing elements with diverse probes at the same positions can be mass-produced. By changing the type and the power of the laser, the number of sheets processed at a time can be adjusted while more than several hundreds of probe-bearing elements can be produced at a time. The polypropylene sheet 22 may be used by itself as a probe-bearing element, or it may be adhered to a reinforcement member (such as a glass, plastic or metal plate, or the like with a thickness of about 1-5 mm) to provide physical reinforcement and easy handling as described above with reference to Figure 4.

[0026] It may not be necessary to adhere each of the polypropylene sheets to each other with an adhesive upon processing if they can be secured mechanically with a securing member or the like. Figures 9A and 9B are schematic views showing an example of a securing member 40 for securing a plurality of sheets without an adhesive. The box-like securing member 40 has an inner space for accommodating a predetermined number of sheets 46. As shown in Figure 9A, the box-like securing member 40 is openable at planes 41 and

42. The upper plane 41 and a bottom plane facing thereto are provided with circular openings 43 and 44, respectively. The size of the circular openings 43 and 44 is determined such that exposed surfaces of the sheets through the openings 43 and 44 are greater than the area to be provided with the through holes 28 with the laser processor 26 (Figure 6).

[0027] Specifically, the planes 41 and 42 are unfolded to put a predetermined pile of sheets in the securing member 40. Then, the planes 41 and 42 are refolded to form a box as shown in Figure 9B. A flap 45 is, for example, applied with an adhesive to seal the box so that the sheets 46 do not move within the securing member 40. The area of the sheet 46 exposed through the opening 43 is subjected to the laser processing described above with reference to Figure 6 to provide a plurality of through holes 28 in concentric circles or in a spiral. As described above, the inner walls of the thorough holes 28 are coated with poly-L-lysine or carbodiimide before injecting biopolymer probes into the through holes 28.

[0028] Figure 10 is a schematic view showing one of the steps in another exemplary method for producing a probe-bearing element of the invention. The probe-bearing element is made from a columnar block of glass, acrylic resin, metal or plastic. As shown in Figure 10, a plurality of through holes 52 are provided through the columnar block 50 made of, for example, polypropylene with a laser processor 51. The plurality of through holes 52 are arranged in concentric circles or in a spiral. The diameter of the through holes 52 is about 10-100 μm .

[0029] The inner walls of the through holes 52 are coated with poly-L-lysine or carbodiimide as described above. Then, probes such as DNA, protein and the like are injected into the through holes 52 to be bound thereto. The probes are injected as described above. As shown in Figure 11, the columnar polypropylene block 50 injected with the probes is sliced into sheets with a thickness of about 100 μm by a laser beam 54 of a laser processor, a wire saw, a band saw, or the like. The sliced polypropylene sheets 55 are individually used as a probe-bearing element. The polypropylene sheet 55 may be used by itself or it may be adhered to a reinforcement member such as a glass, plastic or metal plate (thickness: 1-5 mm) as described with reference to Figure 4. In this manner, identical probe-bearing elements with diverse probes at the same positions can be mass-produced.

[0030] According to the present invention, probe-bearing elements can be mass-produced at low cost with less time and trouble.

[0031] Various other modifications will be apparent to and can be readily made by those skilled in the art without departing from the scope and spirit of this invention. Accordingly, it is not intended that the scope of the claims appended hereto be limited to the description as set forth herein, but rather that the claims be broadly construed.

[0032] All publications, including patent and patent application cited herein are incorporated herein by reference in their entirety.

Claims

1. A probe-bearing element comprising a sheet-like body having a plurality of through holes, wherein each of the plurality of through holes bears a biopolymer probe. 5
2. A probe-bearing element according to claim 1, wherein a thickness of the sheet-like body is 100 μm to 2 mm. 10
3. A probe-bearing element according to either claim 1 or 2, wherein the sheet-like body is made of glass, acrylic resin, metal or plastic. 15
4. A probe-bearing element according to any one of claims 1 to 3, wherein each of the through holes has a diameter of 10 μm to 100 μm . 20
5. A probe-bearing element according to any one of claims 1 to 4, wherein the plurality of through holes are arranged in concentric circles or in a spiral. 25
6. A probe-bearing element according to any one of claims 1 to 5, wherein at least one of the probes borne in the through holes has a length of 200 bases or more. 30
7. A probe-bearing element according to any one of claims 1 to 6, wherein the probe is DNA, RNA or a protein. 35
8. A probe-bearing element according to any one of claims 1 to 7, wherein at least one surface of the sheet-like body is applied with an adhesive. 40
9. A method for producing a sheet-like probe-bearing element having a plurality of through holes bearing biopolymer probes, comprising the steps of:
 - providing a plurality of through holes through 45
 - piled sheet-like bodies;
 - injecting a biopolymer probe into each of the through holes; and
 - separating the sheet-like bodies from each other. 50
10. A method for producing a sheet-like probe-bearing element having a plurality of through holes bearing biopolymer probes, comprising the steps of: 55
 - providing a plurality of through holes through a block-like material;
 - injecting a biopolymer probe into each of the
11. A method for producing a sheet-like probe-bearing element according to either claim 9 or 10, wherein the step of providing a plurality of through holes employs laser irradiation.
12. A method for producing a sheet-like probe-bearing element according to any one of claims 9 to 11, wherein prior to the step of injecting a biopolymer probe into each through hole, the through holes are pretreated in order to promote binding between the through holes and the biopolymer probe.
13. A method for producing a sheet-like probe-bearing element according to claim 12, wherein the pretreatment is conducted by coating the through holes with poly-L-lysine or carbodiimide.

through holes; and
slicing the block-like material into sheets such that every sheet has the plurality of through holes.

FIG. 1

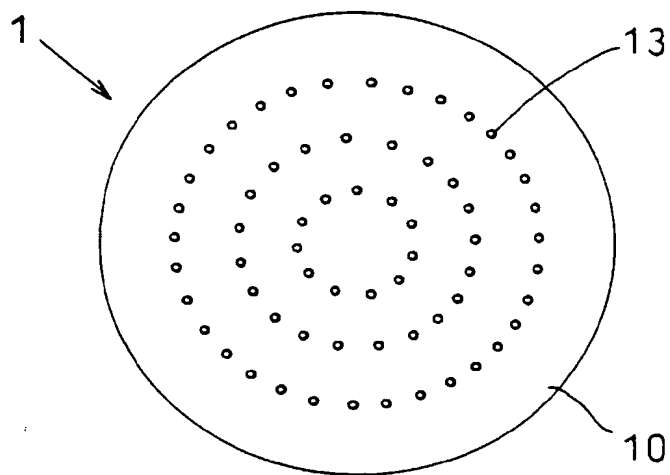


FIG. 2

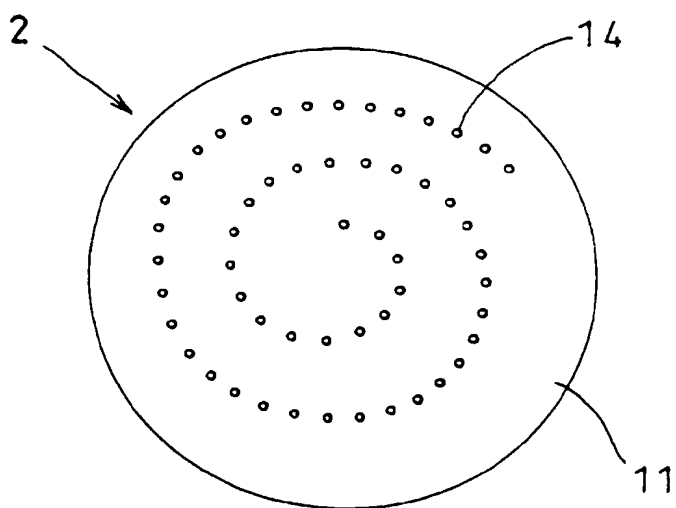


FIG. 3

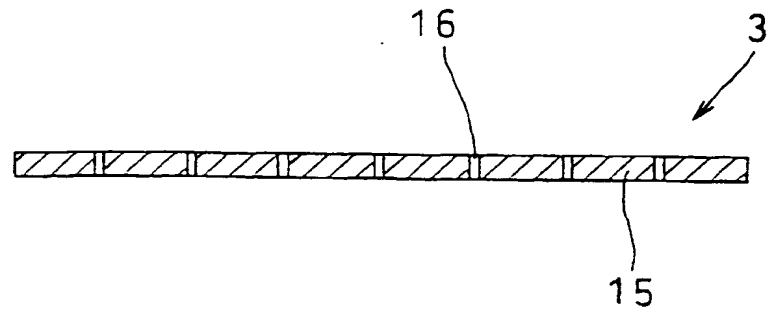


FIG. 4

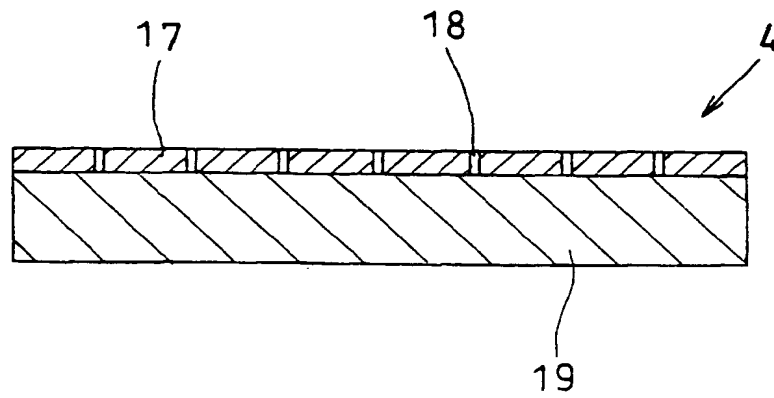


FIG. 5

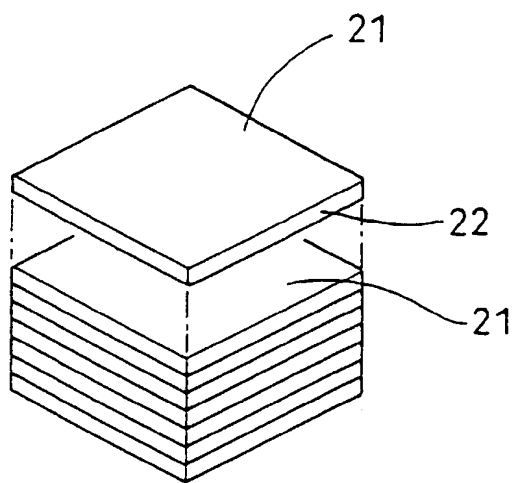


FIG. 6

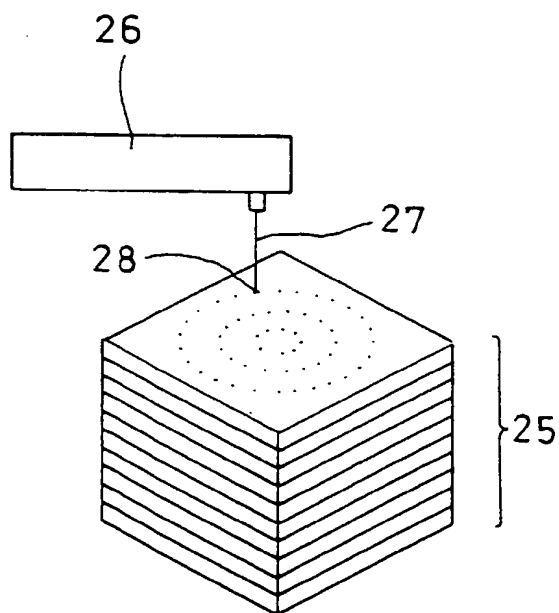


FIG. 7

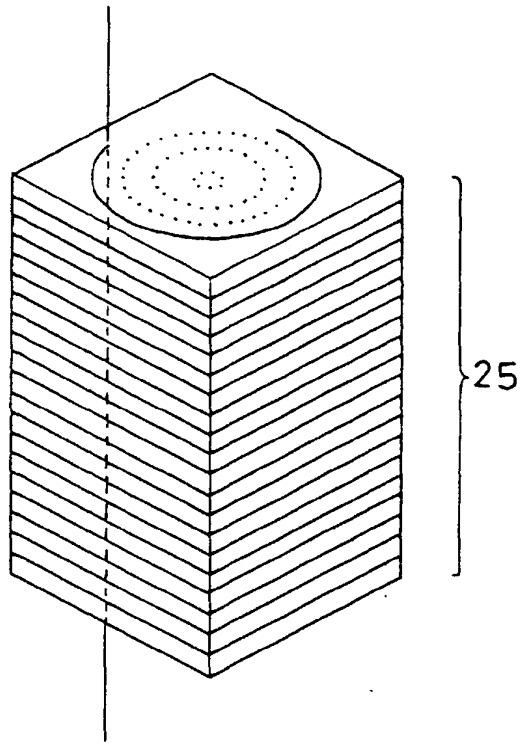


FIG. 8

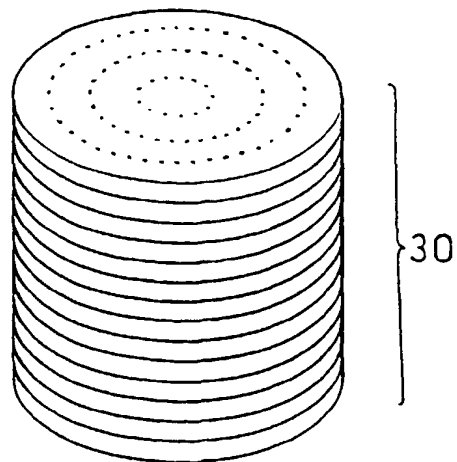


FIG. 9A

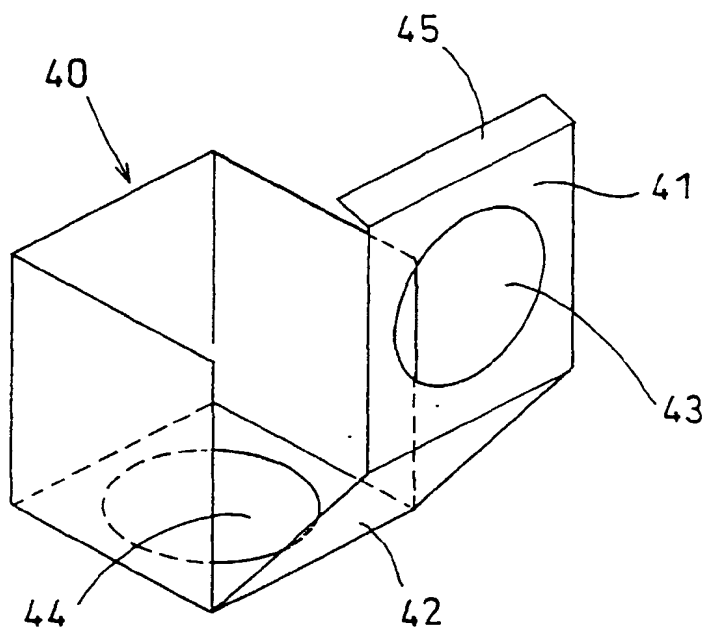


FIG. 9B

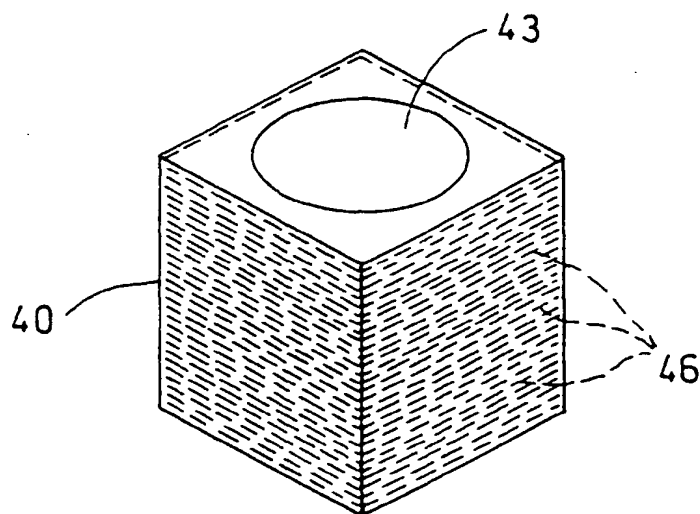


FIG. 10

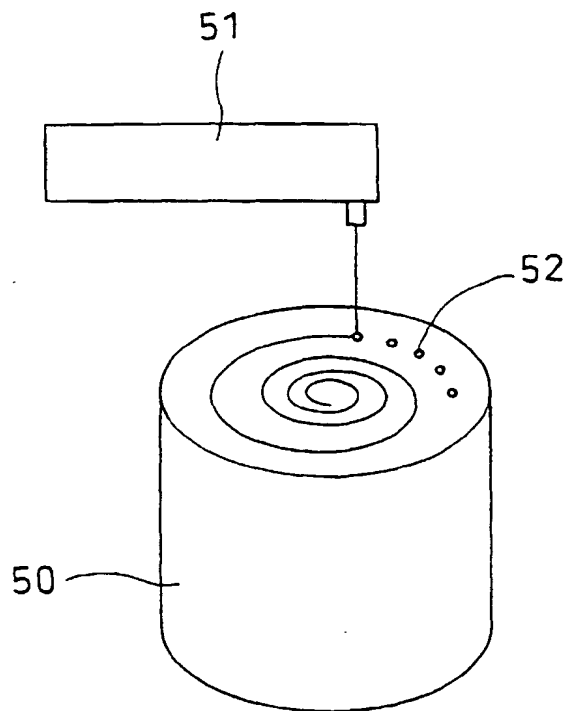
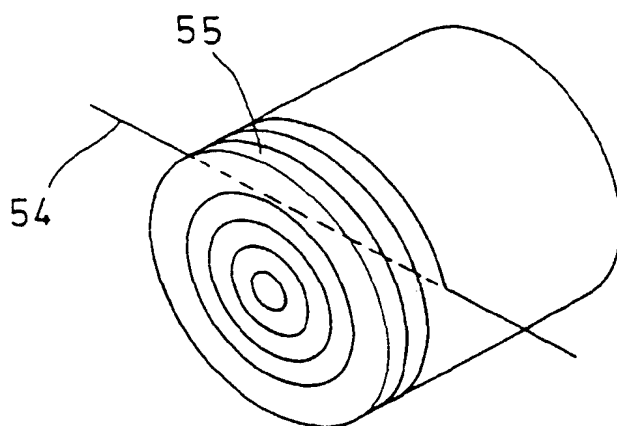


FIG. 11



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 15 JAN 2002

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT) T4

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 15008/PCT ap	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/09808	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 06/10/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 06/10/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK B01L3/00		
Anmelder EVOTEC BIOSYSTEMS AG et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 07/05/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 11.01.2002
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Jochheim, J Tel. Nr. +49 89 2399 8632 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-30 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-16 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/9-9/9 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	4, 5, 7, 10-11, 13, 15
	Nein: Ansprüche	1-3, 6, 8, 9, 12, 14, 16
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	7, 11, 13, 15
	Nein: Ansprüche	1-6, 8-10, 12, 14, 16
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-16: Ja

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt



In diesem Bescheid werden folgende Abkürzungen verwendet: Seite (S), Spalte (Sp), Zeile (Z), Beispiel (Bsp), Anspruch (A), Figur (Fig).

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach **Artikel 35(2) (PCT)** hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: US-A-4 798 706 (BRIGATI DAVID J) 17. Januar 1989 (1989-01-17)

D5: WO 86 06488 A (HICHEM DIAGNOSTICS INC DBA BUR) 6. November 1986 (1986-11-06)

- 1.1 **Anspruch 1 erfüllt nicht die Bedingungen von Artikel 33(2) PCT**, da die **Merkmale** des Anspruchs **nicht neu** sind, wie im Folgenden gezeigt:

Dokument **D1** offenbart ein "Reaktionssubstrat mit einer Kompartimentstruktur, durch die Probenreservoirs gebildet werden (A 1), die matrixartig in geraden Reihen und Spalten angeordnet sind (Fig 1), gekennzeichnet durch ein Bodenteil (A 1), das ein Glas-, Kunststoff-, Metall- oder Halbleitersubstrat umfasst (Sp 5, Z 13-14) und eine im Wesentlichen ebene, glatte Oberfläche besitzt (A 1), und eine flexible Kompartimentschicht aus einem Polymermaterial (A 1 oder Sp 5, Z 11-24), in dem die Probenreservoirs ausgebildet sind, wobei das Polymermaterial eine viskoelastische Polymerzusammensetzung ist, die in bezug auf die Oberfläche des Glas-, Kunststoff-, Metall- oder Halbleitersubstrats eine inhärente Haftfähigkeit besitzt (A 2) und vom Bodenteil im Wesentlichen beschädigungsfrei ohne Einbußen von Form, Haftfähigkeit und Flexibilität trennbar ist (A 7 oder Sp 5, Z 9-10), wobei die Kompartimentschicht von den Probenreservoirs vollständig durchstoßen wird, so dass an den Böden der Probenreservoirs die Oberfläche des Bodenteils frei liegt (A 2)."

Es wird somit festgestellt, dass in **D1** alle Merkmale von Anspruch 1 genannt werden und daher Anspruch 1 nicht neu ist.



Sollte der Anmelder Neuheit in dem Merkmal "wobei das Polymermaterial... ..vom Bodenteil im Wesentlichen beschädigungsfrei ohne Einbußen von Form, Haftfähigkeit und Flexibilität trennbar ist" sehen, so wird er darauf hingewiesen, dass **D1** Sp 5, Z 9-10 vom beauftragten Prüfer ebenfalls so verstanden wird und dass der Fachmann weiss, dass plane Werkstücke aus Elastomeren auf vielen ebenfalls planen Oberflächen, wie Glas oder Kunststoffen haften.

- 1.2 Da Anspruch 1 nicht den Erfordernissen von **Artikel 33(2) PCT** entspricht, ist auch der, als unabhängig formulierte, **Verwendungsanspruch 16 nicht neu**. Es sei in diesem Zusammenhang auch auf **D1** Sp 6, Z 6-20 verwiesen.
Anspruch 16 erfüllt also auch nicht Artikel 33(2) PCT.

- 2.1 **Ansprüche 12 und 14** erfüllen aus folgenden Gründen nicht die Voraussetzungen von **Artikel 33(2) PCT**:

Anspruch 12: Während das Merkmal "Kanäle" gegenüber **D1** neu ist und auch gegenüber **D5**, da der Probenträger in **D5** aus Plastik besteht, so sind die Probenreservoirs, die in **D1** Fig 1 und Fig 3A abgebildet sind, nach Auffassung des beauftragten Prüfers als "Vorratstöpfe" geeignet.

Anspruch 14: Nach Auffassung des beauftragten Prüfers, stellen in **D1** Fig 3A und Fig 4 Titerplatten der beanspruchten Art dar (siehe hierzu auch die zugehörige Textstelle Sp 6, Z 3- 20).

- 2.2 **Die übrigen Ansprüche 2-6, 8-10 erfüllen nicht die Anforderungen der Artikel 33(2) und/oder 33(3) PCT**, da ihre Merkmale entweder aus **D1** bekannt sind (siehe insbesondere Sp 5, Z 7-26), oder sie lediglich eine offensichtliche Wahl aus einer Reihe plausibler Möglichkeiten darstellen, die ein Fachmann in gleicher Weise ohne erfinderischen Schritt treffen würde oder sie bringen keinen, gegenüber dem Stand der Technik unerwarteten, zusätzlichen Effekt.
3. Es sei darauf hingewiesen, dass die Verwendung von Silikonkautschuk als Polymerzusammensetzung und die damit verbundenen, in der Beschreibung auf S 11 erläuterten, Vorteile in keinem der, im ISR angeführten, Dokumente erwähnt werden.

Eine Möglichkeit, im Anspruch 1 den Anforderungen von **Artikel 133 PCT** Genüge zu leisten, wird daher darin gesehen, die Merkmale von Anspruch 7 in Anspruch 1 mitaufzunehmen.

Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Merkmale von Anspruch 6 nicht ausreichen, da elastische Polymere häufig aus Natur- oder Synthesekautschuken bestehen.

4. Die Bedingungen von **Artikel 33(4) PCT** (industrielle Anwendbarkeit) werden erfüllt.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Der Anmelder gibt in der Beschreibung wiederholt an, dass es ferner eine Aufgabe der Erfindung sei, "ein Verfahren zur Herstellung des Reaktionssubstrates und ein Werkzeug zu dessen Durchführung bereitzustellen." Es wird jedoch festgestellt, dass hierfür keine Ansprüche vorliegen und somit Unklarheit über das Schutzbegehren besteht wenn die Beschreibung zur Auslegung der Ansprüche herangezogen wird (siehe auch die PCT Richtlinien, Sektion IV, III-4.3a).

10/089841

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Translation

3

Applicant's or agent's file reference 15008/PCT ap	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/09808	International filing date (day/month/year) 06 October 2000 (06.10.00)	Priority date (day/month/year) 06 October 1999 (06.10.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC B01L 3/00		
Applicant EVOTEC OAI AG		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 07 May 2001 (07.05.01)	Date of completion of this report 11 January 2002 (11.01.2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

in relation to the glass, plastics, metal or semiconductor substrate (Claim 2) and can be separated from the base part essentially without causing much damage and without affecting the shape, adhesive properties or flexibility (Claim 7 or column 5, lines 9-10), the compartment layer being completely penetrated by the sample reservoirs so that the surface of the base part lies freely on the base of the sample reservoirs (Claim 2)".

Consequently, all the features of Claim 1 are specified in **D1** and therefore Claim 1 is not novel.

Should the applicant regard the feature according to which "the polymer material...can be separated from the base part essentially without causing much damage and without affecting the shape, adhesive properties or flexibility" to be novel, it is pointed out that **D1**, column 5, lines 9-10 is also understood to mean such a thing by the examiner and that a person skilled in the art is aware that planar elastomeric workpieces adhere to a number of likewise planar surfaces, such as glass or plastics.

- 1.2 Since Claim 1 does not meet the requirements of **PCT Article 33(2)**, independent **use Claim 16** also **lacks novelty**. In this respect reference is also made to **D1**, column 6, lines 6-20. Consequently, **Claim 16** also does **not satisfy PCT Article 33(2)**.
- 2.1 **Claims 12 and 14** do not meet the requirements of **PCT Article 33(2)** for the following reasons:
- Claim 12:** although the feature of the "channels" is novel over **D1** and also over **D5**, since the sample

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	4, 5, 7, 10-11, 13, 15	YES
	Claims	1-3, 6, 8, 9, 12, 14, 16	NO
Inventive step (IS)	Claims	7, 11, 13, 15	YES
	Claims	1-6, 8-10, 12, 14, 16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: US-A-4 798 706 (BRIGATI DAVID J) 17 January 1989
(1989-01-17)

D5: WO-A-86/06488 (HICHEM DIAGNOSTICS INC DBA BUR)
6 November 1986 (1986-11-06).

1.1 Claim 1 does not meet the requirements of PCT Article 33(2), since the features of the claim are not novel, as shown below:

Document **D1** discloses a "reaction substrate having a compartment structure that forms sample reservoirs (Claim 1) which are arranged in the form of a matrix in straight rows and columns (Figure 1), characterised by a base part (Claim 1) that comprises a glass, plastics, metal or semiconductor substrate (column 5, lines ~~13~~-14) and has an essentially flat, smooth surface (Claim 1), and a flexible compartment layer consisting of polymer material (Claim 1 or column 5, lines 11-24), in which the sample reservoirs are formed, the polymer material being an elasticoviscous polymer composition which has inherent adhesive properties

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/09808

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☒ the international application as originally filed.

☐ the description, pages 1-30, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.

☐ the claims, Nos. 1-16, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.

☐ the drawings, sheets/fig 1/9-9/9, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☐ the claims, Nos. _____

☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

carrier in **D5** is made of plastics, the sample reservoirs depicted in Figures 1 and 3A of **D1** are, in the opinion of the examiner, suitable as "reservoir crucibles".

Claim 14: in the opinion of the examiner, Figures 3A and 4 in **D1** depict titration plates as claimed (see also the corresponding text in column 6, lines 3-20).

2.2 The remaining claims, Claims 2-6 and 8-10, do not meet the requirements of **PCT Article 33(2)** and/or **Article 33(3)**, since the features thereof are either known from **D1** (see, in particular, column 5, lines 7-26), represent merely an obvious choice from a list of plausible possibilities which a person skilled in the art would apply in the same way, without thereby being inventive, or do not result in any unexpected, additional effect in relation to the prior art.

3. It is pointed out that the use of silicon rubber as polymer composition and the advantages associated therewith specified on page 11 of the description are not mentioned in any of the documents listed in the ISR.

Consequently, one possibility of ensuring that Claim 1 meets the requirements of **PCT Article 33** would be to add the features of Claim 7 to Claim 1.

It is expressly pointed out that the features of Claim 6 would not suffice, since elastic polymers usually comprise natural or synthetic rubbers.



•

•

•

•

•

•

•

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The applicant indicates repeatedly in the description that the aim of the invention is also that of developing "a method for producing the reaction substrate and a tool for carrying out said method". However, there are no claims to that effect and therefore a lack of clarity concerning the scope of protection arises if the description is used to interpret the claims (see also the PCT Guidelines, Chapter III-4.3a).

4. The requirements of **PCT Article 33(4)** (industrial applicability) are satisfied.



1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

| | |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year)
09 July 2001 (09.07.01) | |
| International application No.
PCT/EP00/09808 | Applicant's or agent's file reference
15008/PCT ap |
| International filing date (day/month/year)
06 October 2000 (06.10.00) | Priority date (day/month/year)
06 October 1999 (06.10.99) |
| Applicant
BRAKMANN, Susanne et al | |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

07 May 2001 (07.05.01)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

| | |
|---|---|
| The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer
Nestor Santesso
Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|---|---|

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

HERTZ, Oliver
V. Bezold & Sozien
Akademiestrasse 7
80799 München
ALLEMAGNE

| | |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year)
04 février 2002 (04.02.02) | IMPORTANT NOTIFICATION |
| Applicant's or agent's file reference
15008/PCT ap | |
| International application No.
PCT/EP00/09808 | International filing date (day/month/year)
06 octobre 2000 (06.10.00) |

| | | |
|---|---|--|
| 1. The following indications appeared on record concerning: | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> the applicant | <input type="checkbox"/> the inventor | <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative |
| Name and Address
EVOTEC BIOSYSTEMS AG
Schnackenburgallee 114
22525 Hamburg
Germany | State of Nationality
DE | State of Residence
DE |
| | Telephone No. | |
| | Facsimile No. | |
| | Teleprinter No. | |
| 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: | | |
| <input type="checkbox"/> the person | <input checked="" type="checkbox"/> the name | <input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence |
| Name and Address
EVOTEC OAI AG
Schnackenburgallee 114
22525 Hamburg
Germany | State of Nationality
DE | State of Residence
DE |
| | Telephone No. | |
| | Facsimile No. | |
| | Teleprinter No. | |
| 3. Further observations, if necessary: | | |
| 4. A copy of this notification has been sent to: | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office | <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned | |
| <input type="checkbox"/> the International Searching Authority | <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned | |
| <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority | <input type="checkbox"/> other: | |

| | |
|---|--|
| The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer

Gabriele BAEHR |
| Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. April 2001 (12.04.2001)

PCT

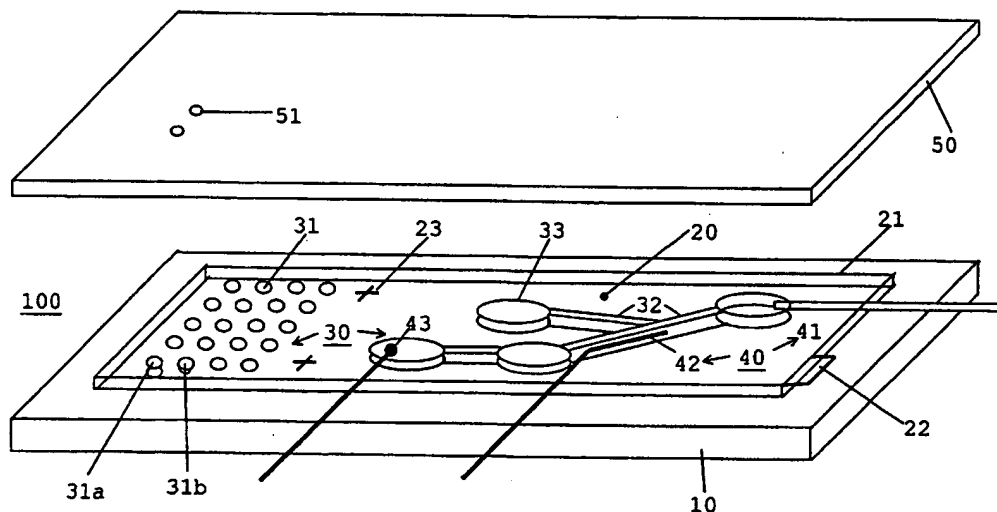
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/24933 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: B01L 3/00 (72) Erfinder; und
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09808 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRAKMANN, Susanne [DE/DE]; Ludwig-Prandtl-Strasse 40, 37077 Göttingen (DE). PEUKER, Helmut [DE/DE]; In der Spitze 10, 37079 Göttingen (DE). SIMM, Wolfgang [DE/DE]; Steinflurweg 2B, 37124 Rosdorf (DE). KETTLING, Ulrich [DE/DE]; Stumpfe Eiche 2, 37077 Göttingen (DE). KOLTERMANN, Andre [DE/DE]; Baumschulenweg 5, 37083 Göttingen (DE). STEPHAN, Jens [DE/DE]; Helmoltstrasse 7, 37081 Göttingen (DE). WINKLER, Thorsten [DE/DE]; Theaterstrasse 27, 37073 Göttingen (DE). DÖRRE, Klaus [DE/DE]; Jüdenstrasse 8, 37077 Göttingen (DE). EIGEN, Manfred [DE/DE]; Georg-Dehio-Weg 14, 37075 Göttingen (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 6. Oktober 2000 (06.10.2000)
(25) Einreichungssprache: Deutsch
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(30) Angaben zur Priorität: 199 48 087.7 6. Oktober 1999 (06.10.1999) DE
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg (DE). (74) Anwalt: HERTZ, Oliver; V. Bezold & Sozien, Akademiestrasse 7, 80799 München (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: STRUCTURED REACTION SUBSTRATE AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

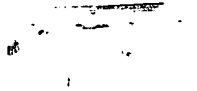
(54) Bezeichnung: STRUKTURIERTES REAKTIONSSUP.STRAT UND VERFAHREN ZU DESSEN HERSTELLUNG



(57) Abstract: The invention relates to a reaction substrate (20) comprised of a base part (10) and of a flexible compartment layer (21) which is made of a polymer material and which is provided with predetermined compartment structures (30) for forming sample compartments. According to the invention, the polymer material is a viscoelastic polymer composition (e.g. silicone rubber) which has an inherent adhesive property with regard to substrates made of glass, plastic, metal or of semiconductors. The invention also relates to a tool for producing the reaction substrate.

(57) Zusammenfassung: Ein Reaktionssubstrat (20) besteht aus einem Bodenteil (10) und einer flexiblen Kompartimentschicht (21) aus einem Polymermaterial mit vorbestimmten Kompartimentstrukturen (30) zur Bildung von Probenkompartimenten, wobei das Polymermaterial eine viskoelastische Polymerzusammensetzung (z.B. Silikonkautschuk) ist, die in bezug auf Glas-, Kunststoff-, Metall- oder Halbleitersubstrate eine inhärente Haftfähigkeit besitzt. Es wird auch ein Werkzeug zur Herstellung des Reaktionssubstrates beschrieben.

WO 01/24933 A1



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09808

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 B01L3/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 B01L B01J

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|----------------------------|
| X | US 4 798 706 A (BRIGATI DAVID J)
17. Januar 1989 (1989-01-17)
Spalte 1, Zeile 19 - Spalte 1, Zeile 49
Spalte 2, Zeile 7 - Spalte 2, Zeile 20
Spalte 4, Zeile 14 - Spalte 4, Zeile 23
Spalte 4, Zeile 38 - Spalte 4, Zeile 59
Spalte 5, Zeile 7 - Spalte 5, Zeile 15 | 1-3, 6, 8,
9, 12, 16 |
| Y | Spalte 5, Zeile 41 - Spalte 6, Zeile 10
Abbildungen 1-3

-/-- | 1-4,
7-10,
12-14, 16 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Dezember 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/12/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Koch, A



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICHE ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------------------|
| Y | US 5 738 825 A (PFEFFERKORN ROLAND ET AL)
14. April 1998 (1998-04-14)
Spalte 2, Zeile 11 - Spalte 2, Zeile 44
Spalte 2, Zeile 63 - Spalte 2, Zeile 65
Spalte 4, Zeile 14 - Spalte 4, Zeile 28
Spalte 4, Zeile 35 - Spalte 4, Zeile 67
Spalte 5, Zeile 23 - Spalte 5, Zeile 34 | 1-3, 8, 9,
12, 14, 16 |
| A | Spalte 5, Zeile 41 - Spalte 5, Zeile 54
Spalte 6, Zeile 41 - Spalte 6, Zeile 55
Spalte 8, Zeile 25 - Spalte 8, Zeile 32
Abbildungen 1-6 | 13 |
| Y | US 5 487 872 A (HAFEMAN DEAN G ET AL)
30. Januar 1996 (1996-01-30)
Spalte 1, Zeile 55 - Spalte 2, Zeile 29
Spalte 3, Zeile 6 - Spalte 3, Zeile 27
Spalte 3, Zeile 59 - Spalte 4, Zeile 20
Abbildungen 1-3 | 7 |
| Y | US 5 681 741 A (ATWOOD JOHN G ET AL)
28. Oktober 1997 (1997-10-28)
Spalte 7, Zeile 66 - Spalte 9, Zeile 19
Spalte 18, Zeile 41 - Spalte 18, Zeile 58
Spalte 19, Zeile 14 - Spalte 20, Zeile 55
Spalte 23, Zeile 52 - Spalte 24, Zeile 50
Abbildungen 1-5, 26-36 | 4, 7, 10,
13 |
| Y | WO 86 06488 A (HICHEM DIAGNOSTICS INC DBA
BUR) 6. November 1986 (1986-11-06)
Seite 6, Absatz 1
Seite 6, Absatz 4
Seite 7, Absätze 2-4
Seite 10, Absatz 1
Seite 10, Absatz 3 - Seite 11, Zeile 8
Abbildungen 1-6 | 10, 12 |
| P, A | EP 0 983 795 A (HITACHI SOFTWARE ENG)
8. März 2000 (2000-03-08)
Spalte 1, Zeile 56 - Spalte 2, Zeile 24
Spalte 3, Zeile 38 - Spalte 4, Zeile 30
Spalte 4, Zeile 47 - Spalte 4, Zeile 49
Spalte 5, Zeile 18 - Spalte 5, Zeile 48
Abbildungen 1-9 | 1-3, 6, 8,
9, 11, 12,
16 |



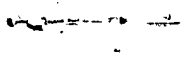
INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09808

| Im Recherchenbericht
angeführtes Patentdokument | Datum der
Veröffentlichung | Mitglied(er) der
Patentfamilie | Datum der
Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| US 4798706 A | 17-01-1989 | US 4731335 A | 15-03-1988 |
| | | CA 1302969 A | 09-06-1992 |
| | | DE 3630866 A | 26-03-1987 |
| | | GB 2180647 A, B | 01-04-1987 |
| | | JP 1804588 C | 26-11-1993 |
| | | JP 5011857 B | 16-02-1993 |
| | | JP 62098231 A | 07-05-1987 |
| | | JP 1932910 C | 26-05-1995 |
| | | JP 5240748 A | 17-09-1993 |
| | | JP 6070603 B | 07-09-1994 |
| | | US 4801431 A | 31-01-1989 |
| | | US 4777020 A | 11-10-1988 |
| | | US 5023187 A | 11-06-1991 |
| US 5738825 A | 14-04-1998 | DE 69420375 D | 07-10-1999 |
| | | DE 69420375 T | 18-05-2000 |
| | | EP 0660924 A | 05-07-1995 |
| | | JP 8504955 T | 28-05-1996 |
| | | WO 9503538 A | 02-02-1995 |
| US 5487872 A | 30-01-1996 | KEINE | |
| US 5681741 A | 28-10-1997 | US 5364790 A | 15-11-1994 |
| | | US 5527510 A | 18-06-1996 |
| | | US 5675700 A | 07-10-1997 |
| | | AT 177024 T | 15-03-1999 |
| | | AU 673397 B | 07-11-1996 |
| | | AU 5505494 A | 18-08-1994 |
| | | AU 705036 B | 13-05-1999 |
| | | AU 6219496 A | 21-11-1996 |
| | | CA 2106360 A | 17-08-1994 |
| | | CN 1095759 A | 30-11-1994 |
| | | DE 69323720 D | 08-04-1999 |
| | | DE 69323720 T | 01-07-1999 |
| | | DK 611598 T | 27-09-1999 |
| | | EP 0611598 A | 24-08-1994 |
| | | EP 0884394 A | 16-12-1998 |
| | | IL 107131 A | 30-09-1997 |
| | | IL 120847 A | 22-09-1999 |
| | | JP 6245771 A | 06-09-1994 |
| | | NZ 248835 A | 21-12-1995 |
| WO 8606488 A | 06-11-1986 | EP 0221105 A | 13-05-1987 |
| EP 0983795 A | 08-03-2000 | JP 2000078998 A | 21-03-2000 |
| | | US 6071702 A | 06-06-2000 |



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. April 2001 (12.04.2001)

PCT

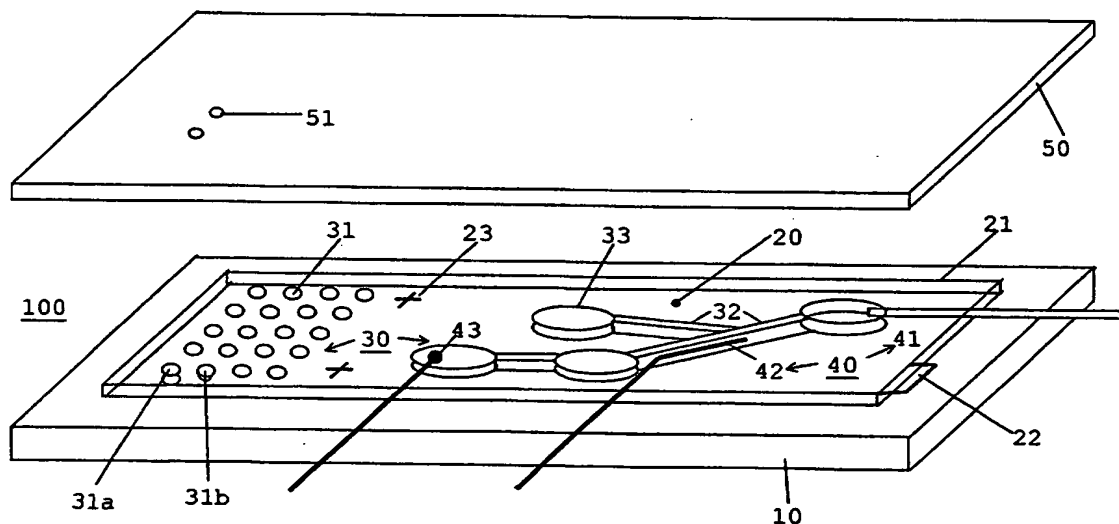
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/24933 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: B01L 3/00 (72) Erfinder; und
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09808 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRAKMANN, Su-
(22) Internationales Anmeldedatum: 6. Oktober 2000 (06.10.2000) sanne [DE/DE]; Ludwig-Prandtl-Strasse 40, 37077 Göt-
(25) Einreichungssprache: Deutsch tingen (DE). PEUKER, Helmut [DE/DE]; In der Spitze
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch 10, 37079 Göttingen (DE). SIMM, Wolfgang [DE/DE];
(30) Angaben zur Priorität: Steinflurweg 2B, 37124 Rosdorf (DE). KETTLING,
199 48 087.7 6. Oktober 1999 (06.10.1999) DE Ulrich [DE/DE]; Stumpfe Eiche 2, 37077 Göttingen (DE).
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von KOLTERMANN, Andre [DE/DE]; Baumschulenweg
US): EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnacken- 5, 37083 Göttingen (DE). STEPHAN, Jens [DE/DE];
burgallee 114, 22525 Hamburg (DE). Helmholtzstrasse 7, 37081 Göttingen (DE). WINKLER,
(74) Anwalt: HERTZ, Oliver; V. Bezold & Sozien, Thorsten [DE/DE]; Theaterstrasse 27, 37073 Göttingen
Akademiestrasse 7, 80799 München (DE). (DE). DÖRRE, Klaus [DE/DE]; Judenstrasse 8, 37077
Göttingen (DE). EIGEN, Manfred [DE/DE]; Georg-De-
hio-Weg 14, 37075 Göttingen (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: STRUCTURED REACTION SUBSTRATE AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

(54) Bezeichnung: STRUKTURIERTES REAKTIONSSUBSTRAT UND VERFAHREN ZU DESSEN HERSTELLUNG



(57) Abstract: The invention relates to a reaction substrate (20) comprised of a base part (10) and of a flexible compartment layer (21) which is made of a polymer material and which is provided with predetermined compartment structures (30) for forming sample compartments. According to the invention, the polymer material is a viscoelastic polymer composition (e.g. silicone rubber) which has an inherent adhesive property with regard to substrates made of glass, plastic, metal or of semiconductors. The invention also relates to a tool for producing the reaction substrate.

(57) Zusammenfassung: Ein Reaktionssubstrat (20) besteht aus einem Bodenteil (10) und einer flexiblen Kompartimentschicht (21) aus einem Polymermaterial mit vorbestimmten Kompartimentstrukturen (30) zur Bildung von Probenkompartimenten, wobei das Polymermaterial eine viskoelastische Polymerzusammensetzung (z.B. Silikonkautschuk) ist, die in bezug auf Glas-, Kunststoff-, Metall- oder Halbleitersubstrate eine inhärente Haftfähigkeit besitzt. Es wird auch ein Werkzeug zur Herstellung des Reaktionssubstrates beschrieben.

WO 01/24933 A1



(81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— *Mit internationalem Recherchenbericht.*

Strukturiertes Reaktionssubstrat und Verfahren
zu dessen Herstellung

Die Erfindung betrifft ein Reaktionssubstrat zur Aufnahme und/oder Manipulierung einer Vielzahl voneinander getrennter Proben, das insbesondere ein strukturiertes Reaktionssubstrat für mikroskopisch kleine Probenmengen bildet, ein Verfahren und ein Werkzeug zu dessen Herstellung und auch Verwendungen des Reaktionssubstrates.

In der Biochemie, Medizin und Gentechnik besteht ein breiter Bedarf an Verfahren zur Manipulierung, Beobachtung und/oder Analyse einer Vielzahl von Proben. Es wurden Testverfahren mit hohem Probendurchsatz (sogenanntes high throughput screening, HTS) entwickelt, bei denen Tausende von Proben hochparallel bspw. isoliert, kultiviert oder bestimmten Behandlungen unterzogen werden. Diese Verfahren werden in speziell angepassten Reaktionssubstraten oder -behältern mit vielen Probenkompartimenten durchgeführt, die eine Vielzahl von Anforderungen erfüllen müssen. Die Reaktionssubstrate müssen bspw. eine schnelle und parallele Probenbeschickung, eine Beobachtung der Probe während der Reaktion und eine weitere Verfügbarkeit der Probe nach einer Reaktion sicherstellen und gegenüber der jeweiligen Reaktion inert sein. Mit dem Fortschreiten des biochemischen Kenntnisstandes und Verbesserungen der Methoden aus Biotechnologie und kombinatorischer Chemie geht das Bedürfnis einher, eine möglichst große Anzahl von möglichst kleinen Probenvolumina parallel verarbeiten, das heißt z. B. handhaben, kontrollieren und vermessen zu können. In jüngster Zeit können auf der Grundlage moderner (Fluoreszenz-)Screeningtechniken pro Tag 10^3 bis 10^5 Proben bei benötigten Volumina von bspw. 10^{-6} bis 10^{-10} l charakterisiert werden. Zur Erhöhung des Probendurchsatzes, Reduzie-



rung des Substanzverbrauchs und auch aus Platzgründen wird eine Miniaturisierung der Probenkompartimente angestrebt. Damit steigen unmittelbar auch die Anforderungen an Reaktionssubstrate mit Kompartimentierung für einzelne Proben stark an. Dies gilt insbesondere in Bezug auf die Anzahl verfügbarer Kompartimente, das Miniaturisierungspotential, die einfache Handhabung und die Kosten bzw. Wiederverwendbarkeit.

Probenträger oder Reaktionssubstrate mit mikroskopisch kleinen Strukturen für den Einsatz bei Fluoreszenz-, Lumineszenz- oder Szintillationsmessungen, z. B. zur Lösung chemischer oder molekular-biologischer Fragestellungen, sind an sich bekannt. In DE-OS 197 12 484, EP 131 934, US 54 17 923 und US 54 87 872 werden Reaktionssubstrate in Form strukturierter Mikroplatten beschrieben, die jeweils eine Vielzahl flächlich angeordneter, einseitig offener Probenkompartimente bilden. Eine Mikroplatte mit einer Filtermembran ist in EP 408 940 beschrieben. Diese Mikroplatte ist wegen ihres komplizierten Aufbaus sowohl für die Herstellung als auch für die Reinigung nachteilig. Die Anzahl verfügbarer Kompartimente ist beschränkt.

Ein weiteres mikrostrukturiertes Reaktionssubstrat wird in WO 95/01559 beschrieben. Auf der Oberseite des Reaktionssubstrates aus einem Halbleitermaterial oder einem Kunststoff sind durch Ätzen Ausnehmungen gebildet, deren Böden hin zur Unterseite zumindest teilweise porös sind. Diese Reaktionssubstrate erlauben zwar Untersuchungen von beiden Seiten her, besitzen jedoch Nachteile in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Herstellung der einzelnen Ausnehmungen und auf die Handhabbarkeit des Reaktionssubstrates. Wenn eine Abdeckung der Ausnehmungen vorgesehen ist, so muss diese gesondert mechanisch festgeklemmt, geklebt oder gebondet werden.

Aus DE-OS 197 52 085 ist ein vereinfacht herstellbares Reaktionssubstrat für mikroskopische Untersuchungen einer Vielzahl von

Proben bekannt, das ein Substrat mit durch Spritzgusstechnik und/oder Heißprägen gebildeten Probenkompartimenten aufweist. Ein Nachteil dieses Reaktionssubstrates ist, dass die mikroskopischen Untersuchungen nur von einer Seite des Substrats, auf der die Probenkompartimente offen sind, durchgeführt werden können. Außerdem ist dieses Reaktionssubstrat nicht allgemein für HTS-Verfahren einsetzbar.

Aus WO 99/19717 ist der Aufbau eines Mikrosystems bekannt, bei dem mindestens ein flexibler, mikrostrukturierter Film als Laminat zwischen festen Trägern angeordnet ist. Der Film besitzt anwendungsabhängig gebildete Mikrostrukturen, in die gegebenenfalls Elektroden integriert sind und die in Zusammenarbeit mit den Trägern Kompartimente für fluidische Proben bilden. Diese Stapeltechnik ist wiederum nachteilig, da gesonderte Maßnahmen zum Verbinden der Träger mit dem Film getroffen werden müssen, die die Handhabung der Proben oder die Proben selbst beeinflussen.

Ein ähnlicher Aufbau ist in EP 324 153 beschrieben. Dabei wird insbesondere ein mit bestimmten Mikrostrukturen versehenes Photopolymer schichtförmig auf einen festen Träger auflaminiert. Der Nachteil dieser Technik besteht darin, dass die Polymerschicht nicht ohne Beschädigung vom Träger entfernt werden kann. Es besteht aber Interesse an Reaktionssubstraten bzw. Probenträgern, die zur Wiederverwendung oder für weitere Verfahrensschritte zur Probenbearbeitung bspw. ohne Beschädigung aus einem Substratverbund lösbar sind.

Ein Verfahren zur Herstellung von Mikrostrukturen auf einer Metalloberfläche ist in WO 97/29223 beschrieben. Die Metalloberfläche wird durch eine photolithographisch strukturierte Polymerschicht hindurch bearbeitet. Mit dieser Technik wird das Problem der Abdeckung von Mikrostrukturen jedoch auch nicht gelöst. Weitere Strukturierungstechniken für Materialien aus Me-



tall oder Halbleitern sind in EP 869 556, WO 97/13633 und WO 98/09745 beschrieben.

Ein genereller Nachteil der herkömmlichen Reaktionssubstrate für den Einsatz in der Mikroskopie betrifft deren relativ dicke, unregelmäßige und/oder durchhängende Böden. Die Böden der herkömmlichen Reaktionssubstrate können aus verschiedenen Materialien, z. B. Glas, bestehen. Typische Glasstärken betragen rund 500 μm . Es können aber auch ausgeprägte, unreproduzierbare Variationen des Bodens (z. B. über 400 μm) auftreten. Die fokale Länge von Immersionsobjektiven ist jedoch typischerweise auf 250 bis 300 μm begrenzt. Bei Abzug der Glasstärke, z. B. eines Deckglases, von rund 150 μm verbleibt noch eine zulässige Varianz des Bodens von rund 100 bis 150 μm , um reproduzierbare, kontinuierliche Messungen an dem Reaktionssubstrat ohne ständige Nachjustierungen der Position des Objektivs in einer Richtung senkrecht zur Ebene des Reaktionssubstrates (nachfolgend als z-Richtung bezeichnet) durchführen zu können.

In den meisten der obengenannten Anforderungen, aber auch hinsichtlich der Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit, können die bisher verfügbaren Reaktionssubstrate oder -behälter oder Proben-träger mit der Entwicklung der Screeningtechnik nicht standhalten.

Es ist die Aufgabe der Erfindung, ein verbessertes Reaktionssubstrat bereitzustellen, mit dem die Nachteile der herkömmlichen Reaktionssubstrate vermieden werden und das insbesondere einen einfachen Aufbau besitzt, unter den interessierenden Reaktionsbedingungen inert ist sowie leicht mit beliebigen Strukturen herstellbar und einfach handhabbar ist. Das neue Reaktionssubstrat soll insbesondere auch mehrfach wiederverwendbar bzw. recyclebar sein. Die Aufgabe der Erfindung ist es insbesondere, ein verbessertes Reaktionssubstrat bereitzustellen, bei dessen Verwendung die Probenhandhabung und -untersuchung, z. B. mit ei-

• nem Mikroskop, insbesondere mit einem konfokalen Mikroskop, vereinfacht werden. Die Aufgabe der Erfindung ist es ferner, ein Verfahren zur Herstellung des Reaktionssubstrates und ein Werkzeug zu dessen Durchführung bereitzustellen.

• Diese Aufgaben werden insbesondere durch ein Reaktionssubstrat mit den Merkmalen gemäß Patentanspruch 1 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Erfindungsgemäß wird ein strukturiertes Reaktionssubstrat bereitgestellt, das durch eine Zusammensetzung eines unten charakterisierten Probenträgers (Kompartimentschicht) mit einem festen Bodenteil gebildet wird, auf der der Probenträger selbständig haftet. Das Bodenteil besteht vorzugsweise aus Glas, Kunststoff, Metall oder einem Halbleitermaterial. Es bildet eine im Wesentlichen ebene, glatte Oberfläche, an der der Probenträger adhärriert ist.

• Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Reaktionssubstrates besteht darin, dass die Kompartimentschicht im Wesentlichen beschädigungsfrei vom Bodenteil abtrennbar ist. Dies bedeutet, dass die Kompartimentschicht von der Bodenplatte (z. B. einem Deckglas) derart entfernt werden kann, dass sie in der Folge ohne wesentliche Einbußen an Form, Haftfähigkeit und/oder Flexibilität wieder eingesetzt werden kann. Zur erneuten Verwendung wird die Kompartimentschicht mit einer neuen oder gereinigten Bodenplatte durch leichten, z. B. manuellen, Druck zu einem neuen Reaktionssubstrat verbunden, dessen Dichtigkeit vollständig der Dichtigkeit des vorher mit der Kompartimentschicht gebildeten Reaktionssubstrates entspricht. Eine im Wesentlichen beschädigungsfreie Ablösung der Kompartimentschicht bedeutet, dass die Funktionalität der Kompartimentschicht durch die Ablösung für spätere Anwendungen unverändert erhalten bleibt.

Die Abhebung der Kompartimentschicht von dem Bodenteil kann vorzugsweise durch Abheben der Kompartimentschicht an einer Ecke vom Bodenteil erfolgen, während dieses an seinen vier Ecken festgehalten wird. An der abgehobenen Ecke wird die Kompartimentschicht hochgebogen und über dem Bodenteil abgerollt, wobei die Kompartimentschicht im Wesentlichen rückstandsfrei von der Bodenplatte getrennt wird. Ein besonderer Vorteil der Erfindung besteht darin, dass dieses Abheben und damit die Wiederverwendung beliebig oft möglich sind. Experimentell konnte eine 50-fache Wiederverwendung ohne Funktionseinbuße bestätigt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Reaktionssubstrat für mikroskopische Untersuchungen ausgelegt. Das Bodenteil besteht aus einem transparenten Material (z. B. Glas) mit anwendungsabhängig gewählter Dicke. Es wird die Aufbringung des Probenträgers auf einem an sich bekannten Deckglas für die Mikroskopie bevorzugt.

Die Dicke des Deckglases beträgt bevorzugt wenige hundert Mikrometer (μm), besonders bevorzugt rund 150 μm . Bei dem verwendeten Mikroskop handelt es sich vorzugsweise um ein konfokales Mikroskop. Das konfokale Mikroskop wird bevorzugt in Verbindung mit Detektionstechnologien, die auf der Detektion von Fluoreszenz basieren, kombiniert. Besonders gut geeignet sind die erfindungsgemäßen Reaktionssubstrate für die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, Fluoreszenz-Koinzidenzanalysen, Fluoreszenzverteilungsanalysen, Fluoreszenzlebensdauermessungen, Fluoreszenz-Energie-Transfer-Analysen oder Fluoreszenz-Polarisationsmessungen unter Verwendung von konfokalen Mikroskopen. Die erfindungsgemäßen Reaktionssubstrate eignen sich somit sehr gut zur Einzelmolekül-Detektion.

Gemäß einem wichtigen Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Probenträger in Form einer flexiblen Kompartimentschicht mit Ausnehmungen zur Bildung einer vorbestimmten Kompartimentstruktur

bereitgestellt, bei dem die Kompartimentschicht aus einer viskoelastischen Polymerzusammensetzung besteht, die selbständig auf Glas-, Kunststoff-, Metall- oder Halbleitersubstraten haftfähig ist. Die Kompartimentschicht ist eine mit Hilfe eines einfachen Abdruckverfahrens herstellbare formstabile Matte, deren Material schon bei einem leichten manuellen Anpressdruck von wenigen Gramm pro cm^2 eine Adhäsionsverbindung, z. B. durch elektrostatische Kräfte und/oder van-der-Waals-Kräfte, mit einem der genannten Substrate eingeht. Die Kompartimentschicht umfasst vorzugsweise im Wesentlichen lösungsmittelfreie Natur- oder Synthesekautschuke oder Zusammensetzungen aus diesen. Besonders bevorzugt wird die Polymerzusammensetzung der Kompartimentschicht aus Klebstoff und lösungsmittelfreien Natur- und Synthesekautschuken gebildet. Die Kompartimentsschicht ist vorzugsweise frei von Zusatzstoffen wie Harzen, Weichmachern und/oder Antioxidantien. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Kompartimentschicht des erfindungsgemäßen Reaktionssubstrates Silikonkautschuk.

Die Ausnehmungen zur Bildung der Kompartimentstrukturen sind durch die Kompartimentschicht durchgehende Löcher oder einseitig in die Kompartimentschicht eingearbeitete Vertiefungen. Es werden geschlossene Kompartimentstrukturen in Form von Probenreservoirien oder Vorratstöpfen und/oder offene Kompartimentstrukturen in Form von in der Schichtebene des Probenträgers verlaufenden Kanälen gebildet. Die Probenreservoirie, Vorratstöpfe und Kanäle werden im Folgenden auch als Probenkompartimente bezeichnet.

Die Kompartimentstrukturen bilden eine Vielzahl von matrixartig in geraden Reihen und Spalten angeordneten Ausnehmungen (Probenreservoirie), wobei das Rastermaß der Matrixanordnung vorzugsweise der Anordnung von Probenreservoirien (sogenannte Wells) von Mikro- und Nanotiterplatten entspricht.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Reaktionssubstrates ist die Kompartimentschicht mit Manipulations- und Untersuchungseinrichtungen ausgestattet. Zu diesen zählen insbesondere Fluidleitungen zur Beschickung der durch die Kompartimentstrukturen gebildeten Probenkompartimente bzw. zur Substanzableitung aus diesen, Sensoreinrichtungen zur Erfassung vorbestimmter Probeneigenschaften in den Probenkompartimenten, Piezopumpen zur Förderung von Fluidströmen und/oder Elektrodeneinrichtungen, die zur Beaufschlagung der Proben in den Probenkompartimenten mit elektrischen Feldern ausgelegt sind. Eine Fluidleitung wird bspw. durch eine in der Schichtebene der Kompartimentschicht verlaufende Kapillare gebildet, die sich vom Rand des Reaktionssubstrates in diesen hinein zu einem bestimmten Probenkompartiment erstreckt. Sensoreinrichtungen umfassen bspw. Temperatur-, pH- oder Leitfähigkeitssensoren. Die Elektrodeneinrichtungen werden vorzugsweise durch Elektrodenstreifen gebildet, die sich an den Wänden der Probenkompartimente erstrecken.

Die Kompartimentstrukturen in einem erfindungsgemäßen Reaktionssubstrat bzw. Probenträger bilden gemäß bevorzugter Ausführungsformen Mikrostrukturen mit charakteristischen Dimensionen im Bereich von 500 nm bis 1,5 mm.

Der Stapelaufbau aus Bodenteil und Probenträger kann erfindungsgemäß dahingehend modifiziert sein, dass auf dem Probenträger auf der zum Bodenteil entgegengesetzten Seite eine Abdeckung angebracht wird, die wiederum durch selbstständiges Anhaften relativ zum Probenträger fixiert ist. Die Abdeckung kann aus einem starren Material wie das Bodenteil oder durch eine flexible Folie gebildet sein. Die Abdeckung kann ferner vorbestimmte Öffnungen zum Zugriff auf die Kompartimentstrukturen aufweisen. Der Stapelaufbau in Sandwich-Form verleiht dem Reaktionssubstrat zusätzliche Stabilität. Die Abdeckung dient zum Unterbinden der Verdunstung von eingebrachten Flüssigkeiten.

Anwendungsabhängig kann vorgesehen sein, dass die Kompartimentschicht aus mehreren getrennten Teilen gebildet wird, die auf einem gemeinsamen Bodenteil zur Bildung eines erfindungsgemäßen Reaktionssubstrates angeordnet werden. Es können auch mehrere Kompartimentschichten aneinander haftend als Stapel verbunden sein, um ein dreidimensionales fluidisches Mikrosystem aufzubauen.

Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung des oben beschriebenen Probenträgers bereitgestellt. Hierzu wird ein Abdruckwerkzeug mit dem jeweils gewünschten Polymermaterial der Kompartimentschicht im gelösten Zustand gefüllt und anschließend das Lösungsmittel durch Tempern und/oder Trocknen, vorzugsweise bei Raumtemperatur, aus der Füllung entzogen bzw. eine Vernetzung der Polymerzusammensetzung herbeigeführt. Das Abdruckwerkzeug besteht insbesondere aus einer strukturierten Grundplatte und einer Gegenplatte, die flüssigkeitsdicht zusammengehalten werden. Die Grundplatte trägt vorspringende Strukturen entsprechend den gewünschten Kompartimentstrukturen im Probenträger. Diese vorspringenden Strukturen ragen von der Grundplatte je nach Anwendungsfall bis zur oder in die Gegenplatte (Ausbildung durchgehender Löcher) oder bis zu einer Höhe mit Abstand von der Gegenplatte (Ausbildung von Vertiefungen). Zur reproduzierbaren Herstellung von Strukturen in Form durchgehender Löcher ist die Gegenplatte vorzugsweise mit einer zur Grundplatte weisenden Beschichtung, z. B. aus PTFE, versehen. Die einzelnen Komponenten der Abdruckvorrichtung sind über lösbare Steck- oder Schraubverbindungen zusammengefügt. Nach dem Lösungsmittelentzug bzw. der Vernetzung der Polymerzusammensetzung werden diese Verbindungen gelöst und die getrocknete feste, formstabile Kompartimentschicht als Probenträger dem Abdruckwerkzeug entnommen. Gegenstand der Erfindung ist auch der Aufbau des Abdruckwerkzeugs an sich.

Der Probenenträger bzw. das Reaktionssubstrat gemäß der Erfindung sind zur Manipulierung und/oder Untersuchung beliebiger flüssiger Proben mit charakteristischen Probenvolumina z. B. im Bereich von 1 nl bis 10 µl ausgelegt. Die flüssigen Proben können insbesondere Lösungen vorbestimmter Reaktionspartner und/oder Suspensionen umfassen, die in einer Suspensionsflüssigkeit synthetische oder biologische Objekte enthalten. Zu den in einem Reaktionssubstrat manipulierten Objekten zählen insbesondere Feststoffpartikel (sogenannte Beads) als synthetische Objekte und biologische Zellen oder Zellbestandteile, Mikroorganismen, Viren und biologisch relevante Makromoleküle als biologische Objekte.

Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Die erfindungsgemäßen Reaktionssubstrate oder Probenenträger können mit einfachen Mitteln mit einem im Wesentlichen drucklos arbeitenden Werkzeug in Massenproduktion hergestellt werden. Über die Gestaltung der Maske oder Abdruckform des Werkzeugs ist ein beliebiges Formatdesign der Probenkompartimente von Makro- bis zu Nanogrößen einfach möglich. Zur Herstellung von Masken für mikroskopisch kleine Kompartimentstrukturen stehen an sich bekannte Bearbeitungstechniken für Glas oder Halbleiter, wie z. B. das LIGA-Verfahren oder konventionelles Ätzen, zur Verfügung. Die Kompartimentstrukturen lassen sich hochpräzise über die gesamte Dicke der Kompartimentschicht herstellen. Die Strukturen können in der Schichtebene charakteristische Dimensionen im Sub-Mikrometer-Bereich und senkrecht dazu im mm-Bereich besitzen.

Die Kompartimentstrukturen können mit beliebigen Formaten, z. B. rund, quadratisch, rechteckig oder mit komplizierteren geometrischen Formen, ausgebildet werden. Die Herstellung der Kompartimentschicht aus einem viskoelastischen Polymer besitzt mehrere Vorteile. Einerseits wird die Anbringung des Probenenträgers auf einem Bodenteil durch einfaches Andrücken erheblich gegenüber herkömmlichen Sandwich-Konstruktionen mit mechanischen Klemm-

Mitteln oder Laminatverbindungen vereinfacht. Andererseits zeichnet sich das Material der Kompartimentschicht, insbesondere bei Verwendung von Silikonkautschuk, durch exzellente Eigenschaften in der Form aus, dass unspezifische Adsorptionen ausbleiben. Dies ist vor allem bei miniaturisierten Proben von Bedeutung. Der Probenträger ist unter den interessierenden Reaktionsbedingungen bei Anwendungen in der Medizin, Biochemie und molekularen Biotechnologie inert. Das biologisch inerte Material ermöglicht das Anziehen, Kultivieren und Messen biologischer Proben oder Substrate in den Reaktionssubstraten oder Probenträgern. Schließlich erlaubt das Material des Probenträgers auch nach dem eigentlichen Einsatz eine Reinigung in einem Bad oder einer Spülmaschine mit herkömmlichen Reinigungs- oder Lösungsmitteln, ohne dass die Form oder Stabilität des Probenträgers nachteilig beeinflusst werden. Der Probenträger ist im Wesentlichen ohne Formverlust und ohne Beeinflussung seiner Hafteigenschaften autoklavier- und sterilisierbar. Durch einfaches Abziehen vom Bodenteil sind die Probenträger wiederverwendbar.

Das erfindungsgemäße Reaktionssubstrat aus Bodenteil mit aufgesetztem Probenträger besitzt besondere Vorteile in Bezug auf den Aufbau des Reaktionssubstrats, die Abdichtung der Probenkompartimente und die gegenseitige Ausrichtung der Probenkompartimente. Der Probenträger wird durch gleichmäßiges Andrücken mit einem definierten, z. B. manuell ausgeübten Druck, mit dem Bodenteil verbunden. Der Probenträger ist ohne Rahmen verwendbar und erlaubt dennoch, bei Aufbringung von Justiermarkierungen, eine exakte räumliche Orientierung und Positionierung, bspw. in Bezug auf ein Mikroskop oder eine Probenbeschickungseinrichtung. Die Abdichtung der Probenkompartimente, die durch durchgehende Ausnehmungen in der Kompartimentschicht gebildet werden, gegenüber dem Bodenteil erfolgt ohne zusätzliche Dicht- oder Klebemittel. Eine Beeinflussung der biochemischen Reaktionen in den Kompartimenten durch derartige Mittel wird ausgeschlossen.

Die Adhäsionsverbindung zwischen dem Probenträger und dem Bodenteil und der Abdeckung ermöglicht die Planarität auch von großflächigeren Reaktionssubstraten oder Probenträgern mit charakteristischen Dimensionen bis zu 118 mm • 82 mm. Über die gesamte Fläche des Bodenteils hinweg können Variationen der Probenkammerpositionen in z-Richtung (senkrecht zur Probenträgerebene) vorzugsweise auf Werte kleiner als 250 µm, besonders bevorzugt kleiner als 150µm, insbesondere kleiner als 100 µm gehalten werden. Dies ist von besonderem Vorteil für mikroskopische Untersuchungen. Während der Vermessung eines Reaktionssubstrats ist es nicht erforderlich, die z-Position des Mikroskopobjektivs laufend nachzujustieren. Die erfindungsgemäßen Reaktionssubstrate eignen sich somit sehr gut zum Einsatz in Testverfahren mit hohem Probendurchsatz (sogenanntes high throughput screening, HTS) in der biotechnischen und/oder chemischen Forschung- und Entwicklung, da die zeitaufwendige Nachjustierung, z. B. von Mikroskopobjektiven, in z-Richtung, entfällt.

Die Stabilität des Reaktionssubstrats ist so hoch wie bei herkömmlichen Probenkammerstrukturen, wobei jedoch erfindungsgemäß auf zusätzliche Kleb- oder Klemmmittel verzichtet werden kann. Die Stabilität wird bei Aufbringung der Abdeckung noch wesentlich erhöht.

Das Reaktionssubstrat besitzt einen breiten Anwendungsbereich, da je nach den Anforderungen ein passendes Bodenteil als Unterlage für den Probenträger verwendet werden kann. Das Bodenteil ist in Bezug auf Material und Dicke frei variierbar. Als transparentes Bodenteil dient vorzugsweise Glas beliebiger Stärke, z. B. mit Deckglasstärke, für den Einsatz in der Mikroskopie. Das Bodenteil kann aus UV-durchlässigem Quarzglas bestehen. Es besitzt hervorragende optische Eigenschaften und wird durch den Probenträger weder chemisch modifiziert noch physikalisch belastet.

Das erfindungsgemäße Abdruckwerkzeug besitzt den Vorteil eines einfachen, modularen Aufbaus. Das Werkzeug kann durch Wechsel der Maske oder Abdruckform einfach an die jeweils gewünschten Anforderungen angepasst werden. Es ist gleichermaßen für Anwendungen im Laborbereich oder in der Massenproduktion geeignet. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können beliebige Strukturen ohne besonderen Aufwand hergestellt werden. Dies ist ein besonderer Vorteil gegenüber den herkömmlichen Techniken zur Strukturierung von Glas oder Halbleitern.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden aus der Beschreibung der beigefügten Zeichnungen ersichtlich. Es zeigen:

- Fig. 1 eine schematische Perspektivansicht eines Reaktionssubstrates mit einem Probenträger gemäß der Erfindung,
- Fig. 2 eine Draufsicht auf eine erste Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Kompartimentschicht,
- Fig. 3, 4 und 5 Illustrationen eines erfindungsgemäßen Abdruckwerkzeugs im zusammengesetzten bzw. auseinandergenommenen Zustand,
- Fig. 6 eine Draufsicht auf ein erfindungsgemäßes Reaktionssubstrat in Form eines Mikroprobenträgers und auf eine herkömmliche Halbleiterstruktur,
- Fig. 7 eine vergrößerte Ausschnittsansicht eines Mikroprobenträgers gemäß Fig. 6,

- Fig. 8 eine Illustration von Einzelheiten der Kompartimentstrukturen bei einem Reaktionssubstrat gemäß den Figuren 6 und 7,
- Fig. 9 eine Draufsicht auf weitere Ausführungsformen eines erfindungsgemäßen Reaktionssubstrates mit Mikrokanälen,
- Fig. 10 ein erfindungsgemäßes Reaktionssubstrat in Form einer schichtförmigen Fluoreszenzküvette,
- Fig. 11 experimentelle Ergebnisse zur Illustration der hervorragenden Planarität erfindungsgemäßer Reaktionssubstrate, und
- Fig. 12 experimentelle Ergebnisse zur Illustration der Dichtheit von Kompartimenten erfindungsgemäßer Reaktionssubstrate.

Die Erfindung wird im Folgenden unter Bezug auf ein Reaktionssubstrat mit einem mikrostrukturierten Probenträger zur Handhabung biologischer Proben beschrieben. Die Erfindung ist jedoch nicht auf Anwendungen beschränkt, bei denen mikroskopisch kleine Probenmengen in Mikrostrukturen manipuliert werden. Des Weiteren ist die Erfindung nicht auf die illustrierten Formen von Probenkompartimenten beschränkt. Anwendungsabhängig können auch beliebige andere Formen mit geraden oder gekrümmten Wänden der Probenkompartimente realisiert werden.

Figur 1 illustriert in schematischer Perspektivansicht ein Reaktionssubstrat mit einem Probenträger gemäß der Erfindung. Auf dem Probenträger sind verschiedene Kompartimentstrukturen und Zusatzeinrichtungen gezeigt, die anwendungsabhängig einzeln oder simultan vorgesehen sein können. Das Reaktionssubstrat 100 umfasst das Bodenteil 10 und den Probenträger 20.

Das Bodenteil 10 ist bspw. eine ebene Glasplatte mit einer Dicke entsprechend der Stärke von Deckgläsern zum Einsatz in der Mikroskopie (rund 150 μm) und einer Fläche von rund 120 mm \cdot 70 mm. Das Bodenteil 10 kann auch durch einen beliebigen anderen Körper mit einer im Wesentlichen glatten, ebenen oder gekrümmten Oberfläche gebildet werden. Vorzugsweise besitzt das Bodenteil eine im Wesentlichen glatte, ebene Oberfläche.

Der Probenträger 20 umfasst eine Kompartimentschicht 21 (Matte) mit Kompartimentstrukturen 30. Die Kompartimentschicht 21 besteht vorzugsweise aus Silikonkautschuk und besitzt eine Dicke von rund 0,5 mm bis 4 mm. An einer oder mehreren Seiten der Matte können eine Lasche 22 zum Abziehen des Probenträgers 20 vom Bodenteil 10 und/oder Justiermarkierungen 23 zum Positionieren des Probenträgers 20 relativ zu einer Mess- oder Probenbeschickungseinrichtung vorgesehen sein. Die Justiermarkierungen 23 sind bspw. punkt- oder kreuzförmige Ausnehmungen in der Oberfläche des Probenträgers 20, die gegebenenfalls mit einer zusätzlichen Markierungssubstanz (z. B. Fluoreszenzfarbstoff) versehen sind. Die Justiermarkierungen besitzen charakteristische Dimensionen, die erheblich geringer als die Dimensionen der Kompartimentstrukturen 30 sein können.

Der Silikonkautschuk ist bspw. Polydimethylsiloxan (PDMS, Hersteller Wacker-Chemie GmbH, Bezeichnung M 4600). Allgemein können elastische Kunststoffe (Elastomere) verwendet werden, die bei verschiedenen Temperaturen elastisch bleiben. In den Elastomeren sind die Molekülketten (Kohlenstoffketten) locker vernetzt, so dass die Elastomere gummielastisch sind. Das bevorzugt verwendete Silikon ist ein Kunststoff aus der Gruppe der Elastomere und besteht hauptsächlich aus Silizium und Sauerstoff. Im unvernetzten Zustand sind die Silikone ölarzig, wasserklar und wärmebeständig. Im vernetzten Zustand bilden die Silikone einen Silikonkautschuk.

Die Kompartimentstrukturen 30 umfassen im Einzelnen geschlossene Probenreservoirire 31 in Form durchgehender Löcher 31a oder in der Oberfläche des Probenträgers abgesenkter Vertiefungen 31b (Durchmesser z. B. rd. 200 µm bis 1,5 mm) oder in der Schichtebene des Probenträgers verlaufende gerade, gekrümmte oder sich verzweigende Kanäle 32. Das Bezugszeichen 33 verweist auf sogenannte Vorratstöpfe, die wie die Probenreservoirire 31 zur Probenaufnahme und -abgabe, allerdings mit größeren Volumina, ausgelegt sind.

Die Manipulations- und Untersuchungseinrichtungen 40 umfassen bspw. eine Fluidleitung in Form mindestens einer Kapillare 41, mindestens einer Elektrode 42 und/oder mindestens eines Sensors 43, die in der Schichtebene des Probenträgers 20, an den Wänden der Kompartimentstrukturen 30 oder in den Kompartimentstrukturen 30 angeordnet sind. Die Kapillare 41 kann bspw. mit einem Proben- oder Reagenzienzufuhrsystem (nicht dargestellt) verbunden sein. Sie wird während der Herstellung des Probenträgers 20 (siehe unten) in diesen eingebettet oder nachträglich in den Probenträger 20 eingestochen. Die Elektroden sind so aufgebaut, wie es an sich aus der Mikrosystemtechnik von Mikroelektroden für elektroosmotische Pumpvorgänge, Manipulationen an Partikeln unter Ausnutzung negativer Dielektrophorese oder Partikelbearbeitungen, wie z. B. Elektroporation an biologischen Zellen, bekannt ist. Die Elektroden bzw. ihre Zuleitungen werden vorzugsweise während der Herstellung des Probenträgers 20 in diesen eingebettet bzw. auf dessen inneren Oberflächen (Wände der Kompartimente) angeordnet.

Figur 1 zeigt ferner eine Abdeckung 50. Die Abdeckung 50 ist kein zwingendes Merkmal des erfindungsgemäßen Reaktionssubstrats. Sie ist anwendungsabhängig vorgesehen und besteht wie das Bodenteil 10 aus einer festen Platte (z. B. aus Glas)

oder aus einer flexiblen Abdeckfolie. Es kann vorgesehen sein, dass die Abdeckung 50 Öffnungen 51 entsprechend den Positionen der Kompartimentstrukturen 30 aufweist. Die Öffnungen 51 dienen der Beschickung von Probenreservoirien 31 oder Vorratstöpfen 33 oder dem Probeneintrag in die Kanäle 32. Sie können mit einer zusätzlichen (nicht dargestellten) Folie als Verdunstungsschutz verschlossen sein.

Eine für praktische Anwendungen in der Biochemie interessierende Ausführungsform einer Kompartimentschicht 21 ist in Figur 2 dargestellt. Die Kompartimentschicht 21 ist eine flexible Matte aus Silikonkautschuk (z. B. Elastosil M 4600 A+B, Hersteller Wacker-Chemie GmbH, Deutschland). Sie besitzt eine Fläche von 118 mm • 82 mm und eine Dicke von 4 mm. Die Probenreservoirie 31 (teilweise dargestellt) sind matrixartig in geraden Reihen und Spalten im Format 48 • 32 angeordnet und besitzen jeweils einen Mittelpunktabstand von 2,25 mm. Dies entspricht dem Standardformat für Mikrotiterplatten mit 1536 Wells. Der Durchmesser jedes Probenreservoirs 31 beträgt 1,5 mm. Das Bezugszeichen 23 verweist auf eine Justiermarkierung, die bei dieser Ausführungsform ebenfalls durch eine Ausnehmung wie die Probenreservoirie gebildet wird und eine Referenzprobe aufnehmen kann.

Der in Figur 2 illustrierte Probenträger 20 oder die Kompartimentschicht 21 wird mit einem Bodenteil (nicht dargestellt) verbunden, das vorzugsweise die gleichen Flächenmaße wie die Kompartimentschicht 21 besitzt. Das Bodenteil ist vorzugsweise ein Deckglas mit einer Dicke von rund 150 µm.

Im Folgenden wird unter Bezug auf die Figuren 3 bis 5 die Herstellung eines erfindungsgemäßen Reaktionssubstrates oder Probenträgers durch Gießen der Kompartimentschicht in einem Abdruckwerkzeug erläutert. Die Figuren zeigen das Abdruckwerkzeug in perspektivischer Phantomansicht bzw. auseinandergezogen in

Perspektiv- bzw. Seitenansicht. Das Abdruckwerkzeug 200 besteht grundsätzlich aus einem geschlossenen Behältnis mit einem inneren Hohlraum entsprechend der äußeren Form der gewünschten Kompartimentschicht bzw. mit inneren Oberflächen, die Vorsprünge entsprechend den gewünschten Kompartimentstrukturen aufweisen. Für einen möglichst universellen Einsatz ist das Behältnis modular aus einer Grundplatte 60, einer Zwischenplatte 70 und einer Gegenplatte 80 aufgebaut, die flüssigkeitsdicht miteinander verbunden werden können. Vorzugsweise sind die Grund-, Zwischen-, und Gegenplatten lösbar miteinander verbunden.

Die Grundplatte 60 trägt auf ihrer zum Inneren des Abdruckwerkzeugs 200 weisenden Seite Vorsprünge zur Strukturbildung in der Kompartimentschicht. Abgesehen von den Vorsprüngen ist die Oberfläche dieser inneren Seite gleichförmig und glatt ausgebildet. Beim dargestellten Beispiel umfassen die Vorsprünge matrixartig angeordnete Stifte 61 (teilweise dargestellt) mit einem Durchmesser entsprechend dem gewünschten Durchmesser der Probenreservoirs 31 (siehe Fig. 2). Die Stifte 61 sind in entsprechende Ausnehmungen auf der Innenseite der Grundplatte 60 eingesteckt. Die Grundplatte und die Stifte bestehen vorzugsweise aus Metall (z. B. Edelstahl oder Aluminium). Für die Vorsprünge zur Strukturbildung können aber auch andere Materialien wie z. B. Silizium oder Glas verwendet werden. Diese Materialien lassen sich mit an sich bekannten, speziellen Ausformungstechniken (z. B. LIGA-Verfahren oder Ätzen) hochpräzise bis in den Sub-Mikrometer-Bereich bearbeiten, wobei die entstehenden Vorsprünge Höhen von bis zu 1 mm aufweisen können. Zur Halterung der Vorsprünge (Metallstifte oder andere Strukturen) kann die Grundplatte 60 einen gesonderten Maskeneinsatz aufweisen. Figur 4 zeigt auch den Metallstift 61a, der zur Bildung der Justiermarkierung 23 (siehe Fig. 2) vorgesehen ist.

Die Zwischenplatte 70 ist ein Abstandhalter, der die Dicke der Kompartimentschicht (Silikonmatte) bestimmt und dessen Innenmaße, die Außenmaße der Kompartimentschicht festlegen. Die Zwischenplatte 70 ist mit einer Einfüllöffnung 71, die mit dem Einfüllstutzen 90 (siehe unten) zusammenwirkt, und Austrittsöffnungen 72 ausgestattet. Die Austrittsöffnungen 72 dienen dem Austritt von verdrängter Luft bzw. überschüssigem Schichtmaterial aus dem Abdruckwerkzeug 200. Die Zwischenplatte 70 ist kein zwingendes Merkmal eines erfindungsgemäßen Abdruckwerkzeugs. Die Funktion des Abstandhalters kann alternativ auch durch entsprechende Strukturen (umlaufende Stufen) an der Grundplatte und/oder der Gegenplatte erfüllt werden.

Die Gegenplatte 80 stellt den Abschluss des Abdruckwerkzeugs 200 gegenüber zur Grundplatte 60 dar. Sie ist ebenfalls eine Metallplatte. Zur Innenseite des Abdruckwerkzeugs 200 hinweisend ist in der Gegenplatte 80 ein Rahmen 81 mit einem Kunststoffeinsatz 82 angeordnet. Der Kunststoffeinsatz 82 ist eine Schicht aus elastisch verformbarem Kunststoff mit einer Dicke von rund 10 mm. Er besteht vorzugsweise aus PTFE. Der Kunststoffeinsatz 82 besitzt Ausnehmungen 83, die zu den Vorsprüngen auf der Grundplatte 60 komplementär sind. Im dargestellten Beispiel sind im Kunststoffeinsatz 82 1536 Bohrungen (teilweise dargestellt) zum Aufnehmen der Metallstifte 61 im zusammengesetzten Zustand des Abdruckwerkzeugs 200 vorgesehen. Die Einbringung der komplementären Ausnehmungen ist nicht zwingend erforderlich. Wenn die Vorsprünge auf der Grundplatte 60 genügend stabil oder der Kunststoffeinsatz 82 genügend leicht deformierbar ist, damit im zusammengesetzten Zustand des Abdruckwerkzeugs 200 die Vorsprünge nicht beschädigt werden, so kann auf gesonderte Ausnehmungen im Kunststoffeinsatz 82 verzichtet werden.

Das Bezugszeichen 20 verweist auf den fertigen Probenträger (gemäß Figur 2), der mit einem Abdruckwerkzeug 200 gemäß den Figuren 3 bis 5 hergestellt wird.

Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, dass die Ausnehmungen 83 im Kunststoffeinsatz 82 durch diesen vollständig durchgebohrt sind und sich auch in entsprechenden Ausnehmungen 84 in der Gegenplatte 80 fortsetzen. Diese Öffnungen dienen dem Austritt von verdrängter Luft bzw. überschüssigem Schichtmaterial.

Der Einfüllstutzen 90 ist außen am zusammengesetzten Abdruckwerkzeug 200 an der Einfüllöffnung 71 befestigt. Er dient dem Einbringen des gelösten Polymermaterials in die zusammengesetzte Werkzeugform.

Das Abdruckwerkzeug 200 wird mit Halterungsstiften 62, 63, 64, 65 zusammengehalten, die durch entsprechende Bohrungen an den Ecken der Grund-, Zwischen- und Gegenplatten führen. Zur Fixierung der Teile ist eine Schraubverbindung (im Einzelnen nicht dargestellt) vorgesehen. Alternativ können auch äußere Klemmeinrichtungen oder ein gesonderter Rahmen zum Zusammenhalten der Platten vorgesehen sein.

Das Abdruckwerkzeug 200 kann wie folgt modifiziert sein. Im Innern der Zwischenplatte 70 kann zusätzlich ein Metallrahmen angebracht sein, der die gewünschten Außenmaße der Kompartimentschicht besitzt und mit dieser auch beim späteren Einsatz verbunden bleibt. Die Stifte 61 können an ihren Enden zur Erleichterung in die Einführung in die entsprechenden Ausnehmungen in der Grund- bzw. Gegenplatte abgerundet sein. Zur Integration der unter Bezug auf Figur 1 genannten Manipulations- und Untersuchungseinrichtungen in den Probenträger 20 kann vorgesehen sein, die Zwischenplatte 70 entsprechend mit Halterungen für diese zusätzlichen Einrichtungen zu versehen.

Diese Halterungen umfassen bspw. Durchtrittsöffnungen im durch die Zwischenplatte 70 gebildeten Rahmen vom Inneren des Abdruckwerkzeugs 200 nach außen, die jeweils mit Fixierungen (z. B. Klemmen) für die jeweiligen zusätzlichen Einrichtungen ausgestattet sind. Schließlich ist es nicht zwingend erforderlich, dass sämtliche Strukturen der gewünschten Kompartimentschicht tatsächlich als Vorsprünge auf der Grundplatte 60 ausgebildet sind. Der fertige Probenträger kann ohne Weiteres noch mit zusätzlichen Strukturen versehen werden (z. B. Einbohren der Vorratstöpfe 33).

Zur Herstellung des Probenträgers wird zunächst das Abdruckwerkzeug 200 zusammengesetzt. Die Stifte 61 werden in die Grundplatte 60 gesteckt. Die Grund-, Zwischen- und Gegenplatten werden zusammengesetzt, so dass die Stifte 61 in die Ausnehmungen 83 im Kunststoffeinsatz 82 ragen. Auf diese Weise entsteht ein nach allen Seiten im Wesentlichen geschlossenes Behältnis, zwischen dessen seitlichen Platten (Grund- und Gegenplatten) sich die Stifte 61 erstrecken. Die Führungsstifte 62 bis 65 werden z. B. mit Flügelmuttern festgezogen. Das zusammengesetzte Werkzeug wird mit vertikal ausgerichteten Platten aufrecht aufgestellt. Die Einfüllöffnung 71 weist nach oben.

Danach wird das Abdruckwerkzeug 200 durch die Einfüllöffnung 71 mit einer Lösung der jeweils gewünschten Polymerzusammensetzung gefüllt. Dies erfolgt vorzugsweise mit einer Spritze direkt in die Einfüllöffnung 71 oder unter Verwendung des Einfüllstutzens 90. Das Einfüllen erfolgt als langsames Einlaufen unter Vermeidung von Spritzern oder Wirbeln, damit das Innere des Abdruckwerkzeugs 200 möglichst gleichförmig gefüllt wird. Vorzugsweise wird die Polymerzusammensetzung im Wesentlichen druckfrei in das Abdruckwerkzeug eingefüllt. Das Einfüllen erfolgt solange, bis die gelöste Polymerzusammensetzung aus den Austrittsöffnungen 72 herausquillt. Diese werden dann bspw. mit einem Klebeband ver-

schlossen. Nach dem Verschließen wird noch geringfügig weiteres Material nachgefüllt.

Anschließend erfolgt das Trocknen oder das Vernetzen der Polymerzusammensetzung vorzugsweise bei Raumtemperatur. Dies kann bspw. rund 8 bis 12 Stunden dauern. Der Lösungsmittelentzug bzw. das Vernetzen der Polymerzusammensetzung kann durch eine Temperierung beschleunigt werden. Schließlich werden die Verbindungen der Platten über die Führungsstifte 62 bis 65 gelöst, die Platten voneinander getrennt und die elastische Kompartimentschicht von der Maske bzw. Abdruckform gezogen. Ein besonderer Vorteil des Einsatzes von Silikonkautschuk besteht hier darin, dass dieses Abziehen ohne Probleme und ohne Beschädigungen des Probenträgers erfolgen kann.

Das Vernetzen erfolgt bei Verwendung des Polymers Elastosil M 4600 vorzugsweise bei Raumtemperatur, kann aber auch bei höheren Temperaturen im Trockenschrank oder einem Ofen durchgeführt werden. Das Vernetzen ist im Wesentlichen ein chemisches Vernetzen, bei dem gegebenenfalls unter Anwesenheit eines Katalysators eine Polymerisierungsreaktion durchgeführt wird. Bei anderen Polymeren erfolgt die Vernetzung bei der jeweils spezifizierten Vernetzungstemperatur.

Es kann sich eine Abschlussbehandlung zum nachträglichen Einbringen von Kompartimentstrukturen (z. B. Vorratstöpfe) oder zur Anpassung bzw. Ausrichtung der zusätzlichen Manipulations- und Untersuchungseinrichtungen anschließen. Auch eine chemische Nachbehandlung der Oberfläche des Probenträgers ist möglich. Der fertige Probenträger wird dann auf ein Bodenteil aufgelegt und mit diesem durch einfaches manuelles Andrücken verbunden.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist am Beispiel eines Mikroprobenträgers für kleinste Flüssigkeitsmengen in

den Figuren 6 bis 8 illustriert. Figur 6 zeigt zunächst einen Größenvergleich zwischen einem erfindungsgemäßen Reaktionssubstrat bzw. einem Probenträger 20 (linker Teil der Abbildung) und einem herkömmlichen Probenträger 20', der aus Silizium hergestellt ist. Auf einer Grundfläche von rund 10 mm • 15 mm trägt der Probenträger 20 eine Matrixanordnung aus insgesamt rund 600 trichterförmig gebildeten Kompartimenten (siehe unten). Jedes Kompartiment besitzt eine charakteristische Querschnittsdimension von rund 0,5 mm. Der herkömmliche Siliziumprobenträger 20' hingegen besitzt ein erheblich größeres Raster, das darüber hinaus mit aufwendigen Prozessierungstechniken hergestellt wurde.

Figur 7 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Probenträgers 20. Diese Abbildung wurde mit einem inversen Mikroskop mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Der Probenträger 20 trägt die in geraden Reihen und Spalten angeordneten Kompartimente 34. Diese besitzen eine sich von der Oberfläche des Probenträgers 20 in die Kompartimentschicht hinein verjüngende Querschnittsform wie eine umgekehrte, abgeschnittene Pyramide. Am Boden besitzen die Kompartimente eine charakteristische Seitenlänge, die ungefähr 1/3 der oberen Kantenlänge beträgt. Der jeweils hell gezeigte Boden wird durch das gemeinsame Bodenteil 10 (siehe Fig. 1) gebildet. Die Kompartimentschicht 21 des Probenträgers 20 wird von den Kompartimenten vollständig durchstoßen.

Ein Probenträger gemäß den Figuren 6 bis 8 wird mit einem entsprechend angepassten Abdruckwerkzeug analog zu dem unter Bezug auf die Figuren 3 bis 5 beschriebenen Verfahren hergestellt. Im Abdruckwerkzeug sind die Vorsprünge auf der Grundplatte dann nicht durch eingesteckte Stifte, sondern pyramidenförmig durch mechanisches Fräsen gebildet. Nach Herstellung der Kompartimentschicht 21 wird diese auf ein Glas-Bodenteil haftend aufgebracht. Dann werden die Kompartimente

gefüllt und anschließend gegebenenfalls mit einem weiteren Glas als Abdeckung oder mit einer Folie verschlossen. Die mikroskopische Vermessung der Proben in den Kompartimenten erfolgt von der Seite des Bodenteils 10 her durch die unteren kleineren Öffnungen der Kompartimentschicht 21. Die Kantenlänge der unteren Öffnungen beträgt jeweils rund 150 µm.

Figur 8 zeigt Einzelheiten der zwischen den Kompartimenten gebildeten Stege. Wie auch aus Figur 7 ersichtlich, ist die Kompartimentschicht so geformt, dass die Wände zwischen den Kompartimenten 34 in Reihenrichtung durchgehende Stege 35 und in Spaltenrichtung unterbrochene Stege 36 bilden. Zwischen den Enden der unterbrochenen Stege 36 und dem jeweils angrenzenden durchgehenden Steg 35 bildet sich ein Überlauf 37. Der Überlauf 37 erlaubt die Herstellung einer Flüssigkeitsverbindung zwischen benachbarten Kompartimenten, ohne ein Übertreten über die obere Oberfläche des Probenträgers 20. Die Anordnung der Überläufe kann anwendungsabhängig modifiziert sein.

In Figur 9 sind verschiedene Gestaltungen von Kanalstrukturen in einem erfindungsgemäßen Probenträger vergrößert dargestellt. Die Kanäle 32 sind allgemein in der Schichtebene offene Probenkompartimente oder Kompartimentstrukturen, deren Ausdehnung in einer Richtung erheblich größer als in einer dazu senkrechten Richtung sind. Kanäle werden im Probenträger geformt, indem zu dessen Herstellung eine Maskenform mit stegförmigen Vorsprüngen auf der Grundplatte des Abdruckwerkzeugs verwendet werden. Die Kanäle können beliebig gerade oder gekrümmt einzeln oder sich verzweigend oder miteinander verbunden verlaufen. Je nach Gestaltung des Probenträgers können sogar in sich geschlossene Kanäle gebildet werden, falls der Kanalboden selbst Teil des Probenträgers ist, die entsprechenden Kompartimentstrukturen also nicht vollständig durch die Kompartimentschicht hindurchgehen.

Figur 9A zeigt eine Kanalstruktur mit mehreren Kanälen 32a bis 32c, die an einem Mischungskreuz 32d verbunden sind. An den Kanalenden befinden sich jeweils Vorratstöpfe 33a bis 33d. Das Bezugszeichen 32e weist auf eine Verengungsstelle. Die Verengungsstelle 32e kann strömungsmechanisch durch Barrieren (ausgewölbte Kanalwand) oder auch elektrisch durch elektrische Feldbarrieren gebildet werden, bspw. um die Fluidströmung vor diesem Bereich zu verzögern und dort Messungen an suspendierten Partikeln in der Fluidströmung durchzuführen.

Eine Abwandlung ist in Figur 9B gezeigt. Zwei Teilkanäle 32a, 32b verbinden sich in einem gemeinsamen Kanal 32c. Diese Struktur dient dem Vermischen von zwei Fluidströmen in einen einzigen Fluidstrom. Der Winkel α zwischen den Teilkanälen 32a, 32b ist anwendungsabhängig zur Erzielung eines gleichförmigen Strömens an dem Mischungspunkt 32d eingestellt. Eine weitere Abwandlung von Strukturen zum Vermischen der Fluidströmungen ist in Figur 9C als Doppelkreuzanordnung mit mehreren Teilkanälen illustriert, die in zwei Mischungspunkte 32d münden.

Die Mäanderform 32f gemäß Figur 9D dient der Schaffung einer besonders langen Messstrecke. Zwischen den Vorratstöpfen 33a bis 33c einerseits und dem Vorratstopf 33d erstreckt sich ein langer, gewundener Kanal in einem Flächenbereich, der bspw. ein Target zur Beleuchtung für Fluoreszenzmessungen bildet.

Die erfindungsgemäßen Reaktionssubstrate oder Probeneträger besitzen besondere Vorteile in Bezug auf die Ausbildung der Kanalstrukturen. Zur Herstellung der Maske für das Abdruckwerkzeug können mit herkömmlichen feinmechanischen Werkzeugen (z. B. CNC-Maschinen) aus gebräuchlichem Werkstoff, vorzugsweise Aluminium oder andere metallische Werkstoffe, beliebige

Kanalverläufe vorbereitet werden. Sie können insbesondere in Bezug auf die Länge, die relative Orientierung (Winkel), die Biegungen und Wendungen, Mischungsstrukturen und Teilkanäle anwendungsabhängig in vorbestimmter Weise gestaltet werden. Kanäle dieser Art lassen sich bis hinab zu Kanalbreiten von rund 6 µm mit herkömmlichen feinmechanischen Werkzeugen präzise und reproduzierbar fertigen. In die Kanäle können Vorsprünge oder Kanten eingearbeitet werden, die ein verbessertes Vermischen mehrerer Fluidströmungen bei der Zusammenführung mehrerer Kanäle ermöglichen. Die Kanäle können mit Elektroden zum Messen der Eigenschaften der Fluidströmungen oder zu deren Manipulierung auf der Grundlage der Elektroosmose, mit Sensoren oder Temperierelementen und auch mit Sperr- oder Ventilelementen sowie Piezopumpen ausgestattet sein.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung mit einer makroskopischen Kompartimentstruktur ist in Figur 10 in Drauf- und Schnittansicht illustriert.

Ein erfindungsgemäßes Reaktionssubstrat oder ein erfindungsgemäßer Probenträger 20 kann auch mit einem einzigen Kammerkompartiment 38 ausgestattet sein. Die Kompartimentschicht 21 ist lediglich ein Ring aus der jeweils verwendeten Polymerzusammensetzung, z. B. Silikonkautschuk. Dieser Ring haftet zwischen einem Bodenteil 10, z. B. einer Glasplatte, und einer Abdeckung 50, so dass eine geschlossene, schichtförmige Küvette z. B. für die Fluoreszenzspektroskopie gebildet wird. Wegen des flüssigkeitsdichten Anhaftens des Probenträgers 20 an den Glasmaterialien des Bodenteils 10 bzw. der Abdeckung 50 kann diese Küvette dauerhaft mit Lösungsmitteln oder Probelösungen beschickt und wie eine Festschichtprobe Fluoreszenzmessungen unterzogen werden.

Die Figuren 11 und 12 illustrieren besondere Vorteile erfindungsgemäßer Reaktionssubstrate hinsichtlich der Planarität der Probenanordnung, die für mikroskopische Untersuchungen von Bedeutung ist, und der well-to-well-Dichtigkeit der Kompartimentstrukturen. Zur Demonstration der Planarität wurde die Variation der z-Position über dem gesamten Bereich der Bodenfläche des Reaktionssubstrates mit einem konfokalen Mikroskopaufbau (Reflektion des Laserstrahls auf der Glasoberfläche des Bodens, aufgenommen mit einer CCD-Kamera) bei einem konventionellen, handelsüblichen Reaktionssubstrat oder Probenträger (linkes Teilbild in Figur 11) und für ein erfindungsgemäßes Reaktionssubstrat (rechtes Teilbild in Figur 11) vermessen.

Bei den konventionellen, handelsüblichen Probenträgern oder Reaktionssubstraten ergibt sich eine für konfokal-fluorimetrische Anwendungen nicht mehr tolerierbare Variation des Plattenbodens in z-Richtung um bis zu 300 µm vom Rand der Platte bis zu ihrer Mitte. Es ist ein eindeutiger Verlauf in eine Richtung („Durchhängen“ des Reaktionssubstrates in seiner Mitte) zu erkennen. Das Reaktionssubstrat, das Gegenstand dieser Anmeldung ist, weist eine Variation des Plattenbodens in z-Richtung von weit weniger als 100 µm auf. Diese Abweichung liegt deutlich unterhalb der Toleranz von rund 150 µm für konfokal-fluorimetrische Anwendungen. Weiterhin ist lediglich eine statistische Fluktuation der z-Abweichung um den Mittelwert nach oben bzw. unten hin zu erkennen, eine Tendenz in der Abweichung findet sich nicht (z. B. kein „Durchhängen“ des Reaktionssubstrates in seiner Mitte).

In Figur 12 sind die 1536 Wells eines erfindungsgemäßen Reaktionssubstrates mit den Ergebnissen von jeweils in den Wells durchgeführten Messungen dargestellt. Für die Untersuchung wurde ein Reaktionssubstrat in Form eines „Schachbrettmusters“ alternierend mit Suspensionen von sogenannten aktiven und sogenannten nicht aktiven Bakterien befüllt (jeweils 330 nl pro Well). Nach

einer Inkubationszeit von 21 h wurden alle Wells gleichmäßig mit jeweils 1 µl Assay versetzt, nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 min wurden sämtliche Wells des Reaktionssubstrates mit Hilfe von CFCA-Messungen (1 s Messzeit pro Well) vermessen.

In Wells, die mit aktiven Bakterien versetzt sind, werden die zweifarbig markierten Assaymoleküle gespalten, so dass das CFCA-Signal klein wird (schwarze Felder im Plot). In Proben, die mit nicht-aktiven Bakterien versetzt sind, werden die zweifarbig markierten Assaymoleküle nicht gespalten, so dass das CFCA-Signal groß bleibt (weiße Felder im Plot). Nur bei insgesamt sechs von 1536 Wells tritt ein „Fehler“ auf, der von einer Undichtigkeit zwischen einzelnen Wells herrühren könnte. Es kann sich dabei aber auch um Fehler handeln, die bereits beim Pipettieren der Bakterien-Suspensionen entstanden sind. Die obere Grenze für Fehler, die durch Undichtigkeiten von Well zu Well auftreten beträgt also höchstens 0,4 %.

Dieses hervorragende Ergebnis ist vorteilhafterweise auch zeitstabil. Das Reaktionssubstrat ist auch nach wenigstens 48 h (Zeit vom Vorbereiten der Proben über Inkubation bis zum Abschluss der Messungen) noch in der Weise stabil, dass die Wells gegeneinander abgeschlossen sind und Messungen in der Platte durchgeführt werden können (ohne Verklebung des Bodenglases, das nach Ende der Messungen wieder entfernt werden kann).

Das in Figur 12 illustrierte Ergebnis zeigt auch, dass das Wachstum der Bakterien von der Kompartimentschicht nicht unterbunden wird (Biokompatibilität).

Die erfindungsgemäßen Probenträger bzw. Reaktionssubstrate können allgemein in allen Gebieten der Biochemie, Biologie oder molekularen Biotechnologie angewendet werden, bei denen eine oder mehrere Proben in definierter Form gehaltert, manipuliert oder verändert werden sollen. Bevorzugte Anwendungen

liegen in der Bearbeitung von Suspensionen mit bestimmten Partikelgemischen. Mit erfindungsgemäßen Reaktionssubstraten können bspw. Zellsortierer, Molekülsortierer oder anderweitige Zellmanipulatoren aufgebaut werden. Es sind sämtliche Anwendungen der fluidischen Mikrosystemtechnik implementierbar.

Die erfindungsgemäßen Reaktionssubstrate sind mit besonderem Vorteil in Syntheseverfahren verwendbar, die auf kombinatorischer Chemie beruhen. Insbesondere können die erfindungsgemäßen Reaktionssubstrate zur Identifizierung und Validierung von Targets, d. h. spezifischen biologischen Molekülen, wie Enzymen, Rezeptoren oder Ionenkanälen verwendet werden. Des Weiteren können sie sehr gut zur Identifizierung von biologisch aktiven Substanzen und/oder pharmazeutischen Wirkstoffen eingesetzt werden. Durch die Möglichkeit der Verwendung der erfindungsgemäßen Reaktionssubstrate in Testverfahren mit hohem Probendurchsatz (sogenanntes high throughput screening, HTS) können deutlich mehr Substanzen innerhalb kurzer Zeit in Bezug auf ihre biologische Aktivität und/oder pharmazeutische Wirksamkeit untersucht werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, um die mittels kombinatorischer Chemie erhaltenen Substanzbanken in Bezug auf ihre biologische Aktivität und/oder pharmazeutische Wirksamkeit zu untersuchen. Es ist mit den erfindungsgemäßen Reaktionssubstraten möglich, einen hohen Probendurchsatz zu erreichen und zwischen mehreren Tausend bis zu 100000 Substanzen pro Tag zu untersuchen.

Die erfindungsgemäßen Reaktionssubstrate sind weiterhin sehr gut für die Durchführung von Assay-Verfahren geeignet. Bei diesen Assay-Verfahren werden Targets und chemische Verbindungen zur Untersuchung von chemischen und/oder biologischen Wechselwirkungen kombiniert. Es ist somit auf einfachem Wege möglich, ein Modellsystem zu etablieren, das es erlaubt, Substanzen zu identifizieren, die das Target in der gewünschten Weise beeinflussen. Die erfindungsgemäßen Reaktionssubstrate können sowohl für bio-

chemische als auch zelluläre Assay-Verfahren verwendet werden. Eingeschlossen sind dabei auch Assay-Verfahren die auf der Verwendung von vesikulären Partikeln oder Feststoffpartikeln (sogenannte Beads) basieren.

Die erfindungsgemäßen Reaktionssubstrate eignen sich weiterhin sehr gut zur Durchführung von Assay-Verfahren, die auf der Verwendung von vereinfachten Modellsystemen beruhen, die die Physiologie im Menschen oder im Tier nachbilden. Dies bedeutet, die Assay-Systeme können u. a. dazu verwendet werden, Informationen über die Löslichkeit von biologisch aktiven und/oder pharmazeutisch wirksamen Substanzen im Blutplasma, ihre Penetrationseigenschaften, ihre Leber-Toxizität, ihre Bioverfügbarkeit, ihre Stabilität im Blut oder ihre Abbauprofile nach Passage der Leber zu erhalten.

Die chemischen und biotechnischen Untersuchungen können bspw. i) zur Identifizierung und Charakterisierung von synthetischen oder biologischen Objekten, ii) zur Identifizierung und Charakterisierung von chemischen Verbindungen, iii) zur Identifizierung und/oder Validierung von Targets, iv) zur Suche nach biologisch aktiven Substanzen und/oder pharmazeutischen Wirkstoffen, v) zur Identifizierung von Leitstrukturen, vi) zur Genomanalyse, vii) zur Proteomanalyse, viii) zur Reinigung und Konzentrierung von Substraten, oder ix) zur evolutionen Optimierung von biologisch relevanten Makromolekülen verwendet werden.

Patentansprüche

1. Reaktionssubstrat (100) mit einer Kompartimentstruktur (30), durch die Probenreservoirre (31) gebildet werden, die matrixartig in geraden Reihen und Spalten angeordnet sind, **gekennzeichnet durch**
ein Bodenteil (10), das ein Glas-, Kunststoff-, Metall- oder Halbleitersubstrat umfasst und eine im Wesentlichen ebene, glatte Oberfläche besitzt, und
eine flexible Kompartimentschicht (21) aus einem Polymermaterial, in dem die Probenreservoirre (31) ausgebildet sind, wobei das Polymermaterial eine viskoelastische Polymerzusammensetzung ist, die in bezug auf die Oberfläche des Glas-, Kunststoff-, Metall- oder Halbleitersubstrats eine inhärente Haftfähigkeit besitzt und vom Bodenteil (10) im Wesentlichen beschädigungsfrei ohne Einbußen von Form, Haftfähigkeit und Flexibilität trennbar ist, wobei die Kompartimentschicht (21) von den Probenreservoirren (31) vollständig durchstoßen wird, so dass an den Böden der Probenreservoirre (31) die Oberfläche des Bodenteils freiliegt.
2. Reaktionssubstrat gemäß Anspruch 1, bei dem das Bodenteil aus einem transparenten Material besteht.
3. Reaktionssubstrat gemäß Anspruch 2, bei dem das Bodenteil (10) eine im Wesentlichen ebene, glatte Glasplatte ist.
4. Reaktionssubstrat gemäß Anspruch 3, bei dem die Glasplatte die Dicke eines Deckglases besitzt, das in der Mikroskopie eingesetzt wird.

5. Reaktionssubstrat gemäß Anspruch 4, bei dem die Dicke des Deckglases rd. 150 μm beträgt.
6. Reaktionssubstrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Polymerzusammensetzung klebstoff- und lösungsmittelfreie Natur- oder Synthesekautschuke umfasst.
7. Reaktionssubstrat gemäß Anspruch 6, bei dem die Polymerzusammensetzung Silikonkautschuk umfasst.
8. Reaktionssubstrat gemäß Anspruch 6, bei dem die Polymerzusammensetzung klebstofffrei auf dem Bodenteil (10) haftet.
9. Reaktionssubstrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Kompartimentschicht (21) vom Bodenteil (10) im Wesentlichen beschädigungsfrei ohne Einbußen von Form, Haftfähigkeit und Flexibilität trennbar ist.
10. Reaktionssubstrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Kompartimentschicht (21) auf der zum Bodenteil (10) entgegengesetzten Seite eine Abdeckung (50) trägt.
11. Reaktionssubstrat gemäß Anspruch 10, bei dem die Abdeckung (50) Durchtrittsöffnungen (51) zur Beschickung der Kompartimentstrukturen (30) mit flüssigen Proben oder zur Entnahme solcher Proben aufweist.
12. Reaktionssubstrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Kompartimentstrukturen (30) neben den Probenreservoirs (31) Kanäle (32) und/oder Vorratstöpfe (33) umfassen.

13. Reaktionssubstrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem in der Kompartimentschicht (21) Manipulations- und Untersuchungseinrichtungen (40) vorgesehen sind, die Fluidleitungen (41), Elektroden (42) und/oder Sensoren (43) umfassen.

14. Reaktionssubstrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, das eine Mikro- oder Nanotiterplatte bildet.

15. Reaktionssubstrat gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem Variationen der Probenreservoirpositionen in einer Richtung senkrecht zur Ebene des Reaktionssubstrates über die gesamte Fläche des Bodenteils hinweg weniger als 250 µm, bevorzugt weniger als 150 µm, besonders bevorzugt weniger als 100 µm betragen.

16. Verwendung eines Reaktionssubstrates gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15:

- zur Identifizierung und Charakterisierung von synthetischen oder biologischen Objekten,
- zur Identifizierung und Charakterisierung von chemischen Verbindungen,
- zur Identifizierung und/oder Validierung von Targets,
- zur Suche nach biologisch aktiven Substanzen und/oder pharmazeutischen Wirkstoffen,
- zur Identifizierung von Leitstrukturen,
- zur Genomanalyse
- zur Proteomanalyse,
- zur Reinigung und Konzentrierung von Substraten, oder
- zur evolutiven Optimierung von biologisch relevanten Makromolekülen.



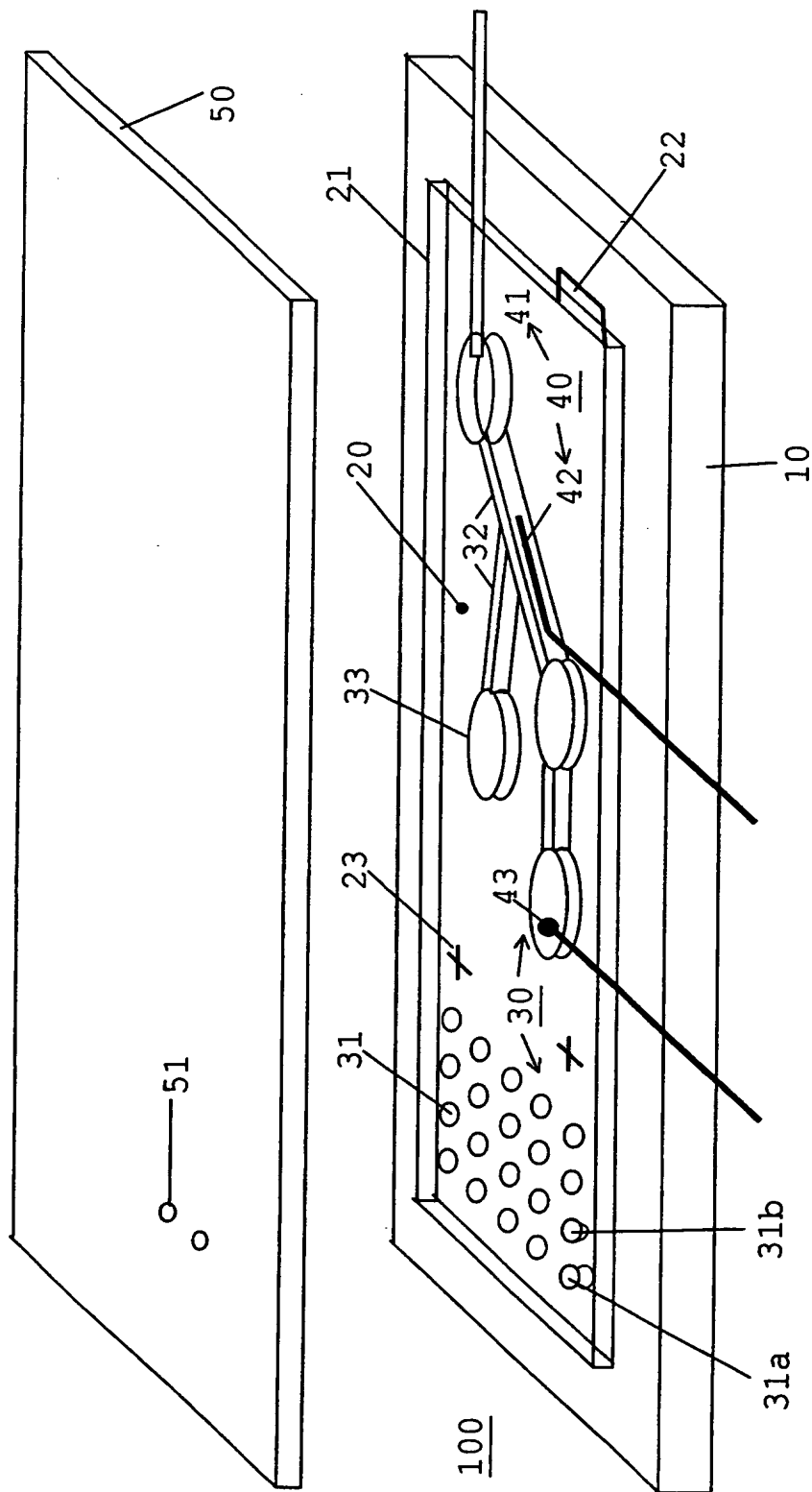
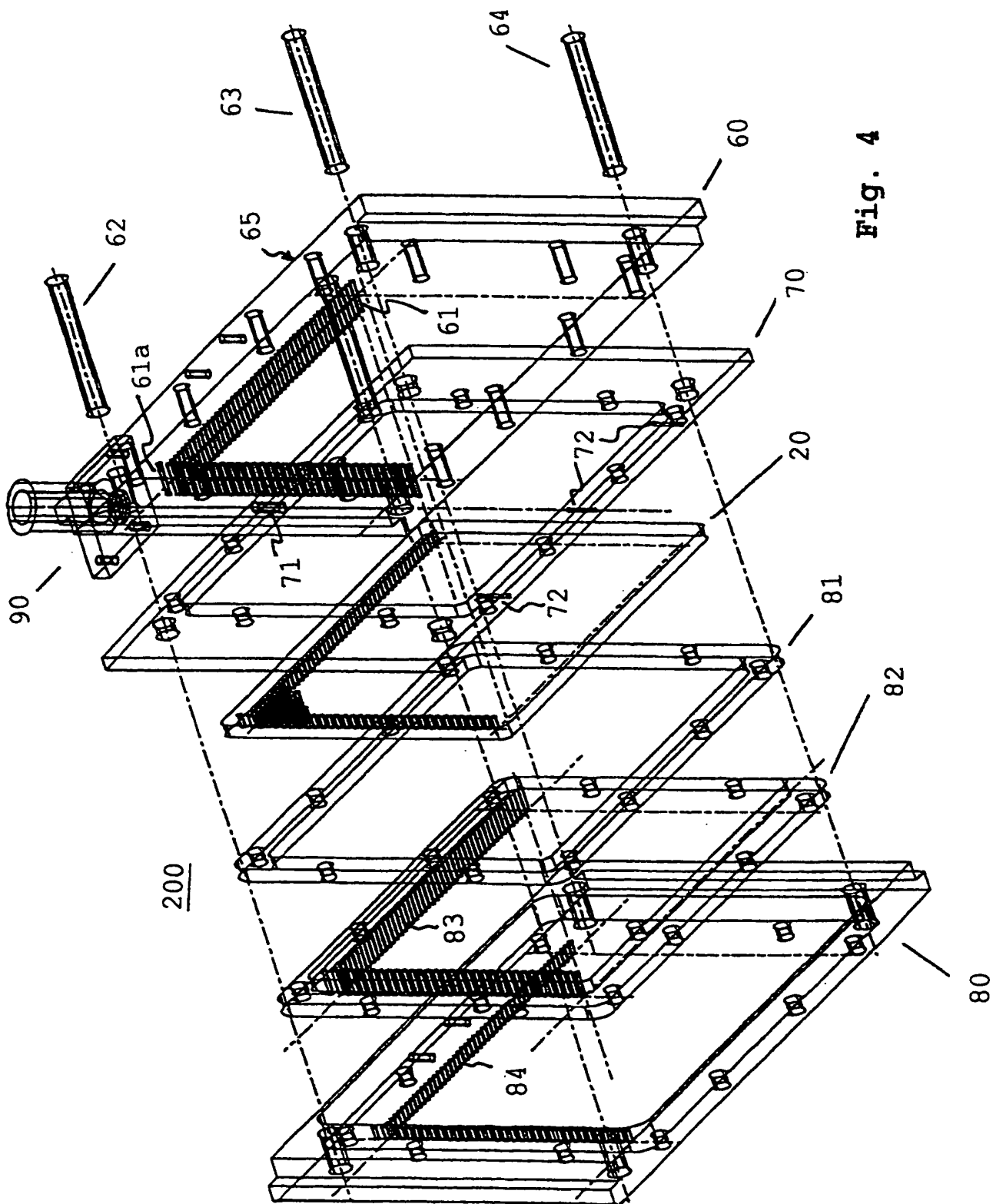


Fig. 1







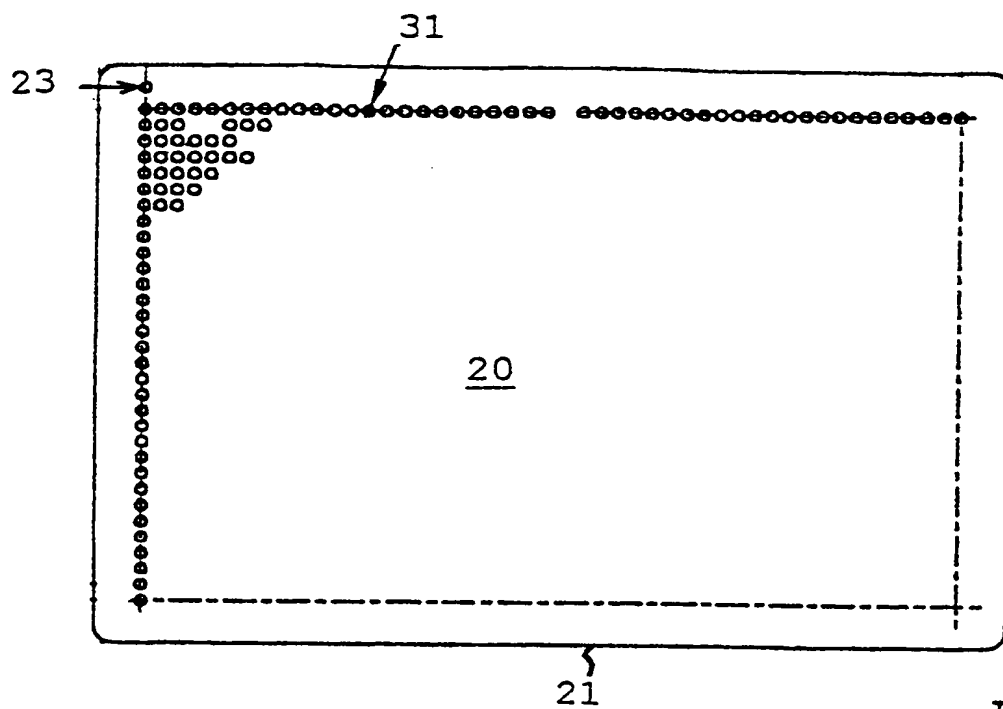


Fig. 2

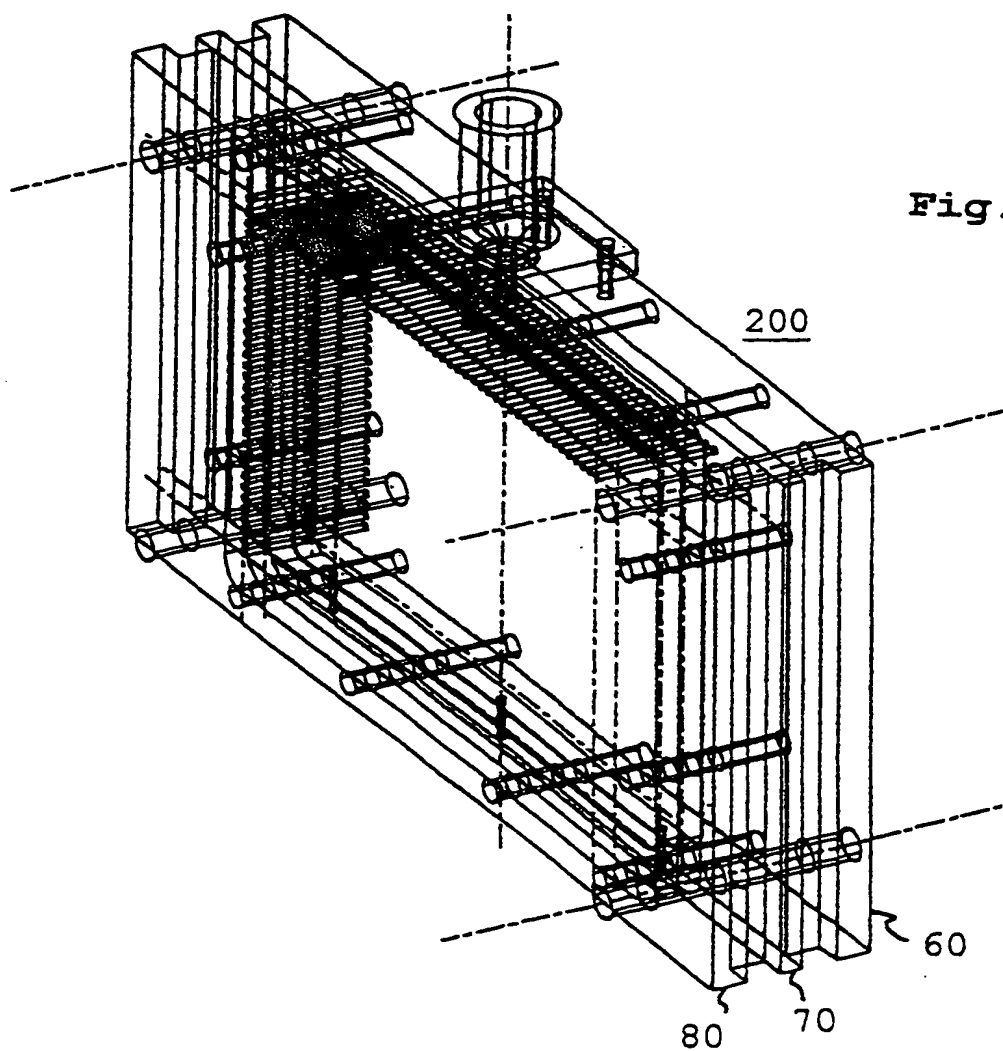
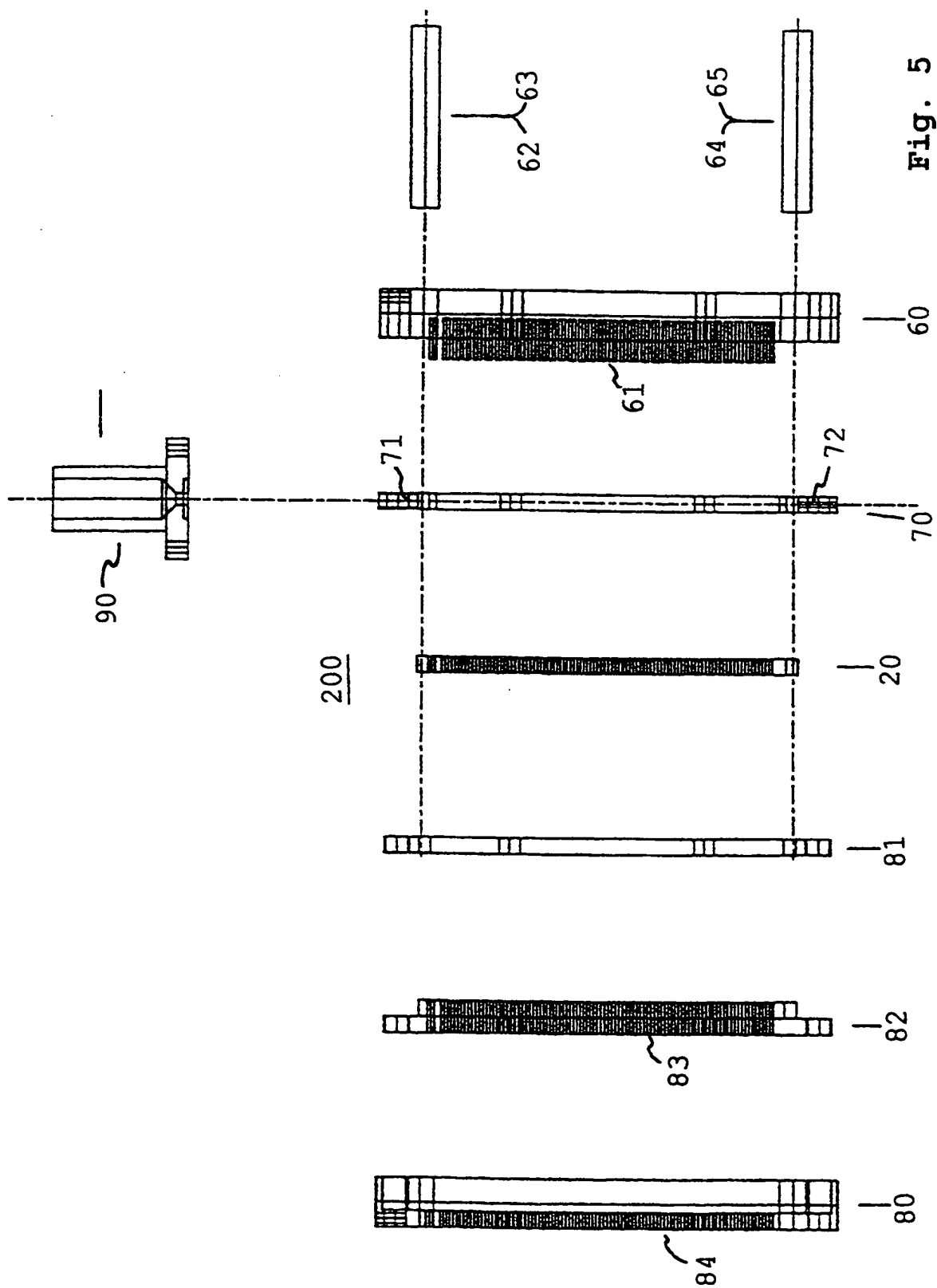


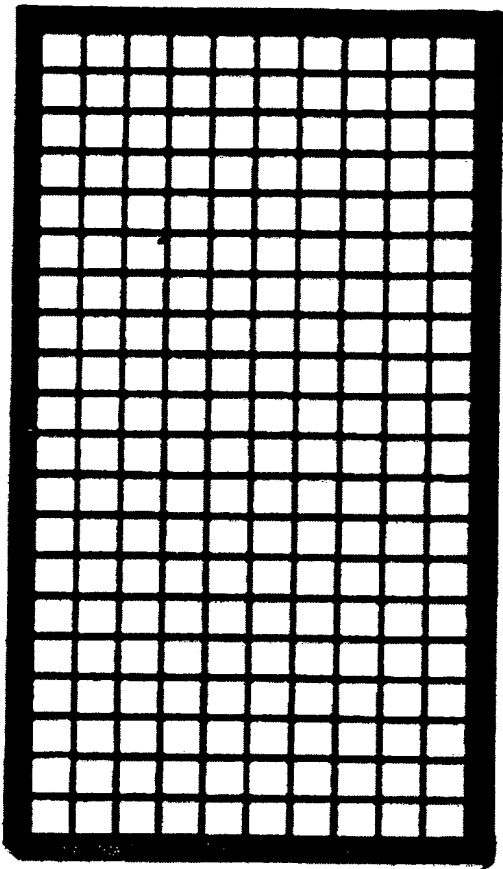
Fig. 3







20'



20

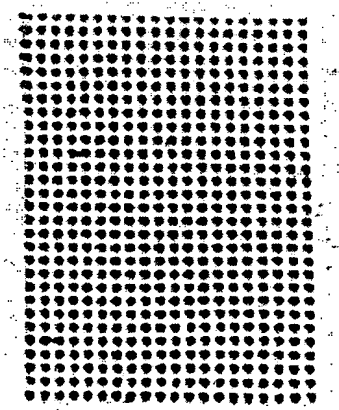
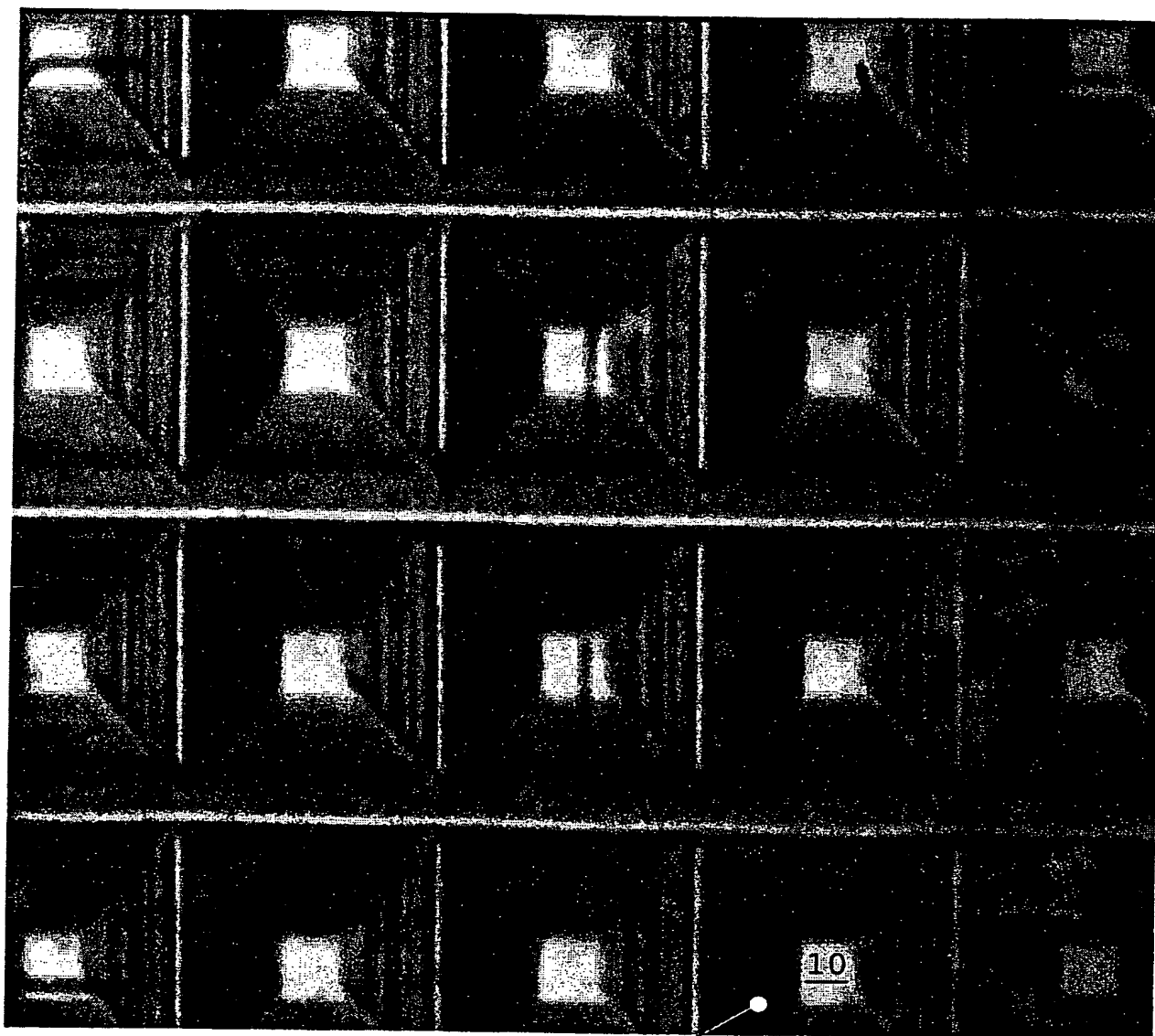


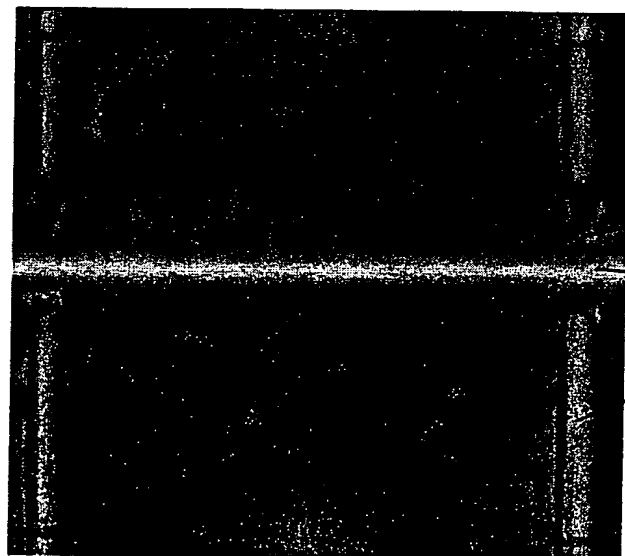
Fig. 6





34 21 20

Fig. 7



37
35
36

Fig. 8



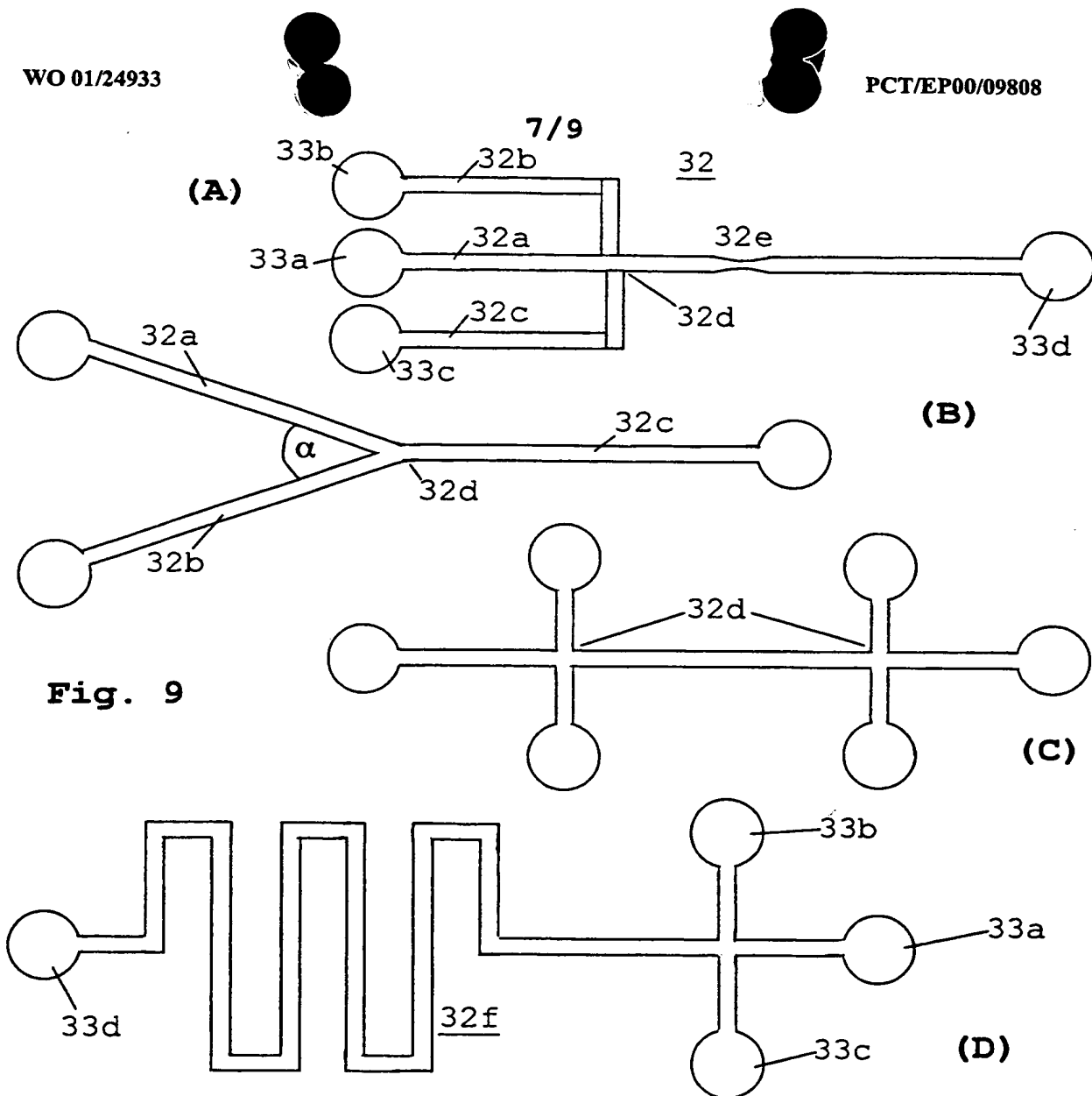
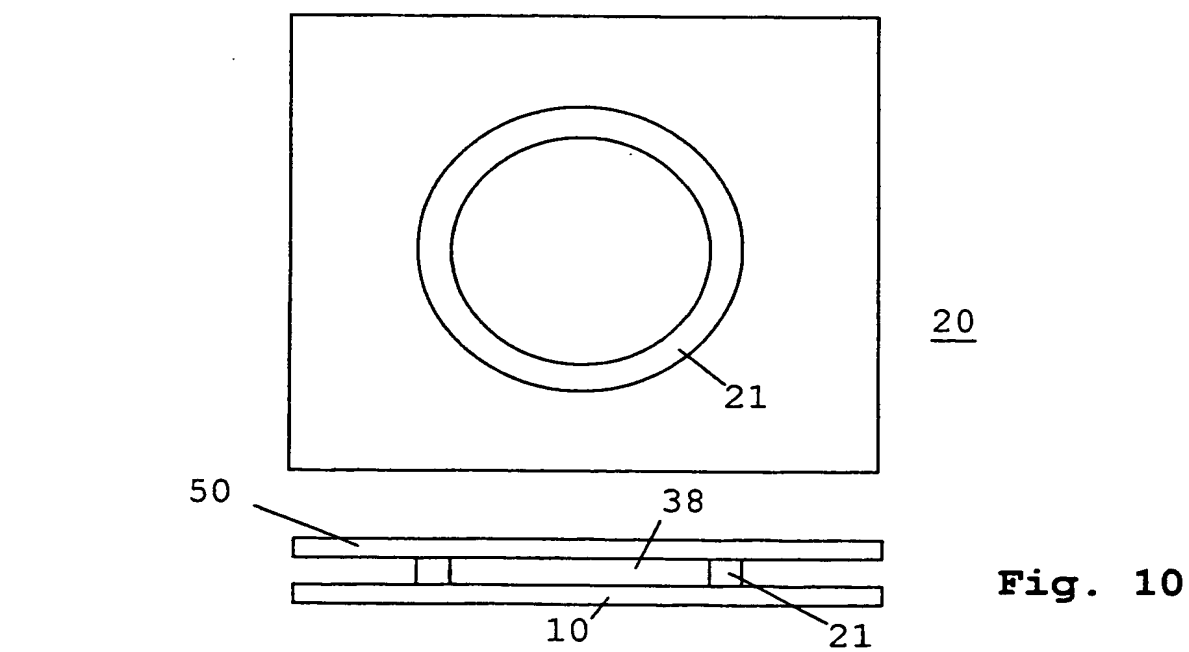
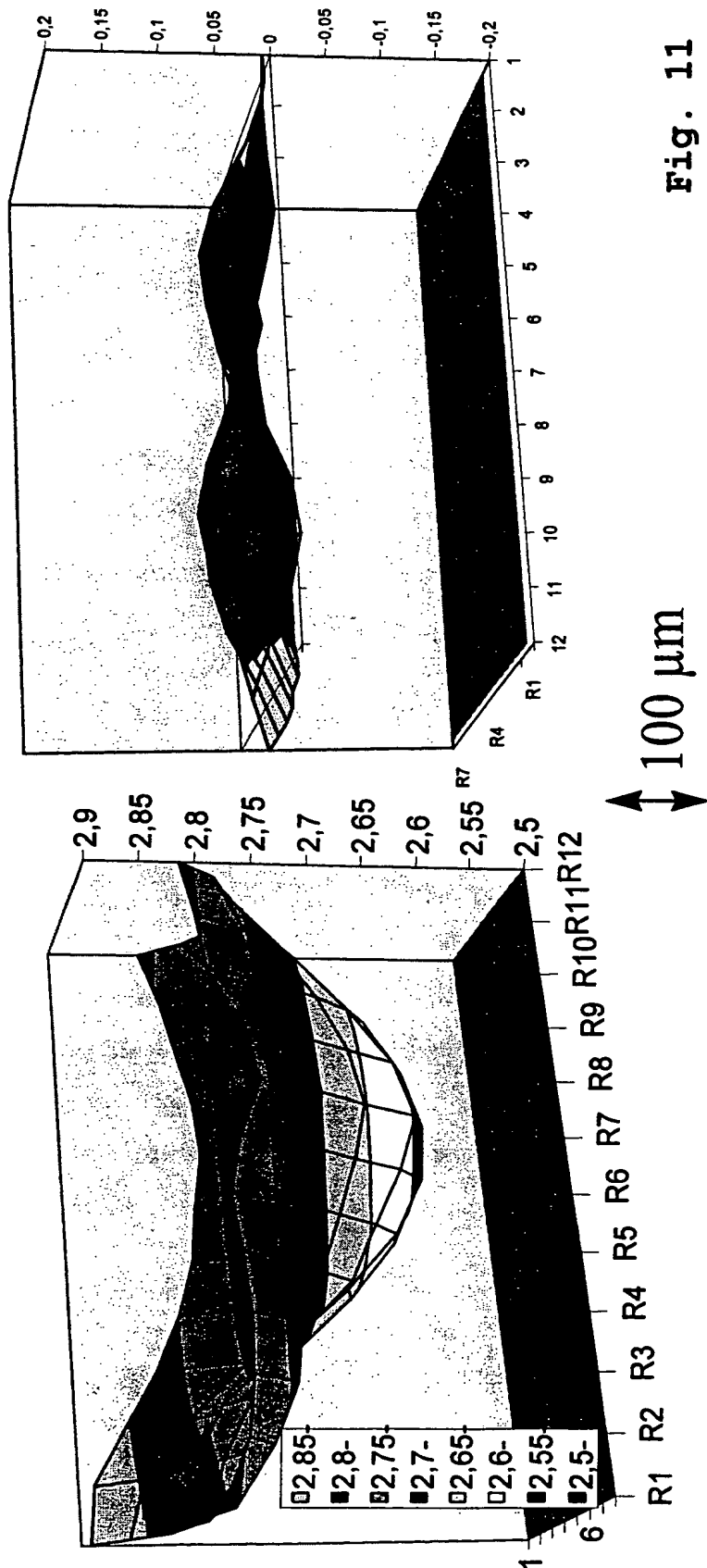
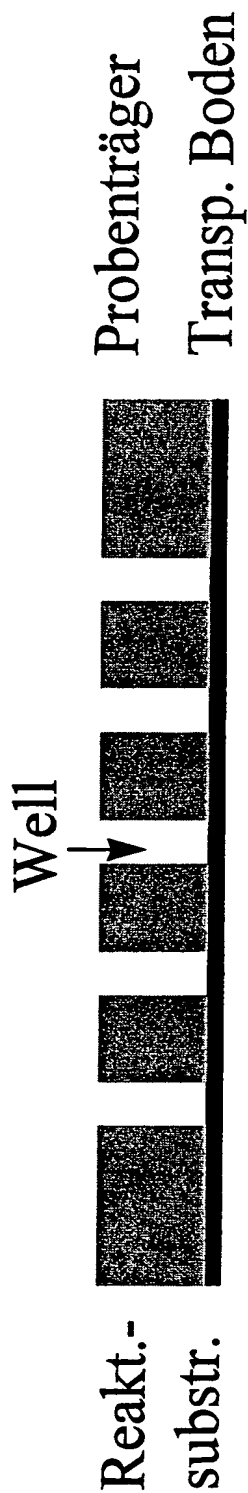


Fig. 9







Herkömmlicher Probenträger

Erfindungsgemäßes Reaktionssubstrat



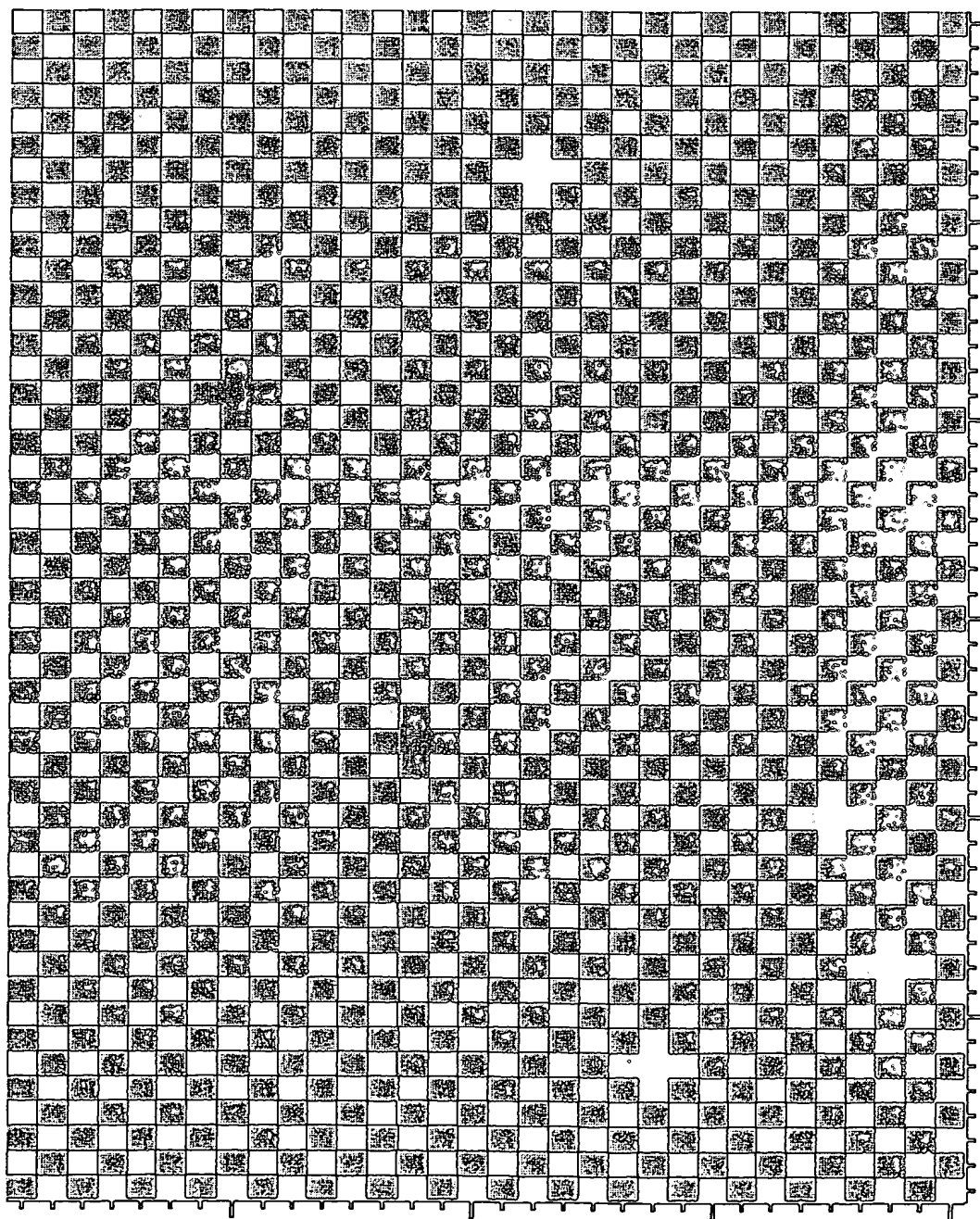


Fig. 12

weiss: keine aktiven Bakterien detektiert

schwarz: aktive Bakterien detektiert



5

6

7

8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/ 00/09808

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 B01L3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 B01L B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|---------------------------|
| X | US 4 798 706 A (BRIGATI DAVID J)
17 January 1989 (1989-01-17)
column 1, line 19 -column 1, line 49
column 2, line 7 -column 2, line 20
column 4, line 14 -column 4, line 23
column 4, line 38 -column 4, line 59
column 5, line 7 -column 5, line 15 | 1-3,6,8,
9,12,16 |
| Y | column 5, line 41 -column 6, line 10
figures 1-3

-/-- | 1-4,
7-10,
12-14,16 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 December 2000

Date of mailing of the international search report

15/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Koch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent Application No.

T/EP 00/09808

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|--------------------------------|
| Y | US 5 738 825 A (PFEFFERKORN ROLAND ET AL)
14 April 1998 (1998-04-14)
column 2, line 11 -column 2, line 44
column 2, line 63 -column 2, line 65
column 4, line 14 -column 4, line 28
column 4, line 35 -column 4, line 67
column 5, line 23 -column 5, line 34 | 1-3, 8, 9,
12, 14, 16 |
| A | column 5, line 41 -column 5, line 54
column 6, line 41 -column 6, line 55
column 8, line 25 -column 8, line 32
figures 1-6 | 13 |
| Y | US 5 487 872 A (HAFEMAN DEAN G ET AL)
30 January 1996 (1996-01-30)
column 1, line 55 -column 2, line 29
column 3, line 6 -column 3, line 27
column 3, line 59 -column 4, line 20
figures 1-3 | 7 |
| Y | US 5 681 741 A (ATWOOD JOHN G ET AL)
28 October 1997 (1997-10-28)
column 7, line 66 -column 9, line 19
column 18, line 41 -column 18, line 58
column 19, line 14 -column 20, line 55
column 23, line 52 -column 24, line 50
figures 1-5, 26-36 | 4, 7, 10,
13 |
| Y | WO 86 06488 A (HICHEM DIAGNOSTICS INC DBA
BUR) 6 November 1986 (1986-11-06)
page 6, paragraph 1
page 6, paragraph 4
page 7, paragraphs 2-4
page 10, paragraph 1
page 10, paragraph 3 -page 11, line 8
figures 1-6 | 10, 12 |
| P, A | EP 0 983 795 A (HITACHI SOFTWARE ENG)
8 March 2000 (2000-03-08)

column 1, line 56 -column 2, line 24
column 3, line 38 -column 4, line 30
column 4, line 47 -column 4, line 49
column 5, line 18 -column 5, line 48
figures 1-9 | 1-3, 6, 8,
9, 11, 12,
16 |

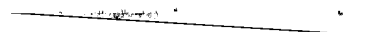
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/09808

| Patent document
cited in search report | Publication
date | Patent family
member(s) | Publication
date |
|---|---------------------|---|--|
| US 4798706 A | 17-01-1989 | US 4731335 A
CA 1302969 A
DE 3630866 A
GB 2180647 A, B
JP 1804588 C
JP 5011857 B
JP 62098231 A
JP 1932910 C
JP 5240748 A
JP 6070603 B
US 4801431 A
US 4777020 A
US 5023187 A | 15-03-1988
09-06-1992
26-03-1987
01-04-1987
26-11-1993
16-02-1993
07-05-1987
26-05-1995
17-09-1993
07-09-1994
31-01-1989
11-10-1988
11-06-1991 |
| US 5738825 A | 14-04-1998 | DE 69420375 D
DE 69420375 T
EP 0660924 A
JP 8504955 T
WO 9503538 A | 07-10-1999
18-05-2000
05-07-1995
28-05-1996
02-02-1995 |
| US 5487872 A | 30-01-1996 | NONE | |
| US 5681741 A | 28-10-1997 | US 5364790 A
US 5527510 A
US 5675700 A
AT 177024 T
AU 673397 B
AU 5505494 A
AU 705036 B
AU 6219496 A
CA 2106360 A
CN 1095759 A
DE 69323720 D
DE 69323720 T
DK 611598 T
EP 0611598 A
EP 0884394 A
IL 107131 A
IL 120847 A
JP 6245771 A
NZ 248835 A | 15-11-1994
18-06-1996
07-10-1997
15-03-1999
07-11-1996
18-08-1994
13-05-1999
21-11-1996
17-08-1994
30-11-1994
08-04-1999
01-07-1999
27-09-1999
24-08-1994
16-12-1998
30-09-1997
22-09-1999
06-09-1994
21-12-1995 |
| WO 8606488 A | 06-11-1986 | EP 0221105 A | 13-05-1987 |
| EP 0983795 A | 08-03-2000 | JP 2000078998 A
US 6071702 A | 21-03-2000
06-06-2000 |



INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 00/09808

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 B01L3/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Researchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B01L B01J

Researchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die researchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|----------------------------|
| X | US 4 798 706 A (BRIGATI DAVID J)
17. Januar 1989 (1989-01-17)
Spalte 1, Zeile 19 - Spalte 1, Zeile 49
Spalte 2, Zeile 7 - Spalte 2, Zeile 20
Spalte 4, Zeile 14 - Spalte 4, Zeile 23
Spalte 4, Zeile 38 - Spalte 4, Zeile 59
Spalte 5, Zeile 7 - Spalte 5, Zeile 15 | 1-3, 6, 8,
9, 12, 16 |
| Y | Spalte 5, Zeile 41 - Spalte 6, Zeile 10
Abbildungen 1-3

-/-- | 1-4,
7-10,
12-14, 16 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15/12/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Koch, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie° | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|----------------------------|
| Y | US 5 738 825 A (PFEFFERKORN ROLAND ET AL)
14. April 1998 (1998-04-14)
Spalte 2, Zeile 11 -Spalte 2, Zeile 44
Spalte 2, Zeile 63 -Spalte 2, Zeile 65
Spalte 4, Zeile 14 -Spalte 4, Zeile 28
Spalte 4, Zeile 35 -Spalte 4, Zeile 67
Spalte 5, Zeile 23 -Spalte 5, Zeile 34
Spalte 5, Zeile 41 -Spalte 5, Zeile 54
Spalte 6, Zeile 41 -Spalte 6, Zeile 55
Spalte 8, Zeile 25 -Spalte 8, Zeile 32
Abbildungen 1-6 | 1-3,8,9,
12,14,16 |
| A | --- | 13 |
| Y | US 5 487 872 A (HAFEMAN DEAN G ET AL)
30. Januar 1996 (1996-01-30)
Spalte 1, Zeile 55 -Spalte 2, Zeile 29
Spalte 3, Zeile 6 -Spalte 3, Zeile 27
Spalte 3, Zeile 59 -Spalte 4, Zeile 20
Abbildungen 1-3 | 7 |
| Y | US 5 681 741 A (ATWOOD JOHN G ET AL)
28. Oktober 1997 (1997-10-28)
Spalte 7, Zeile 66 -Spalte 9, Zeile 19
Spalte 18, Zeile 41 -Spalte 18, Zeile 58
Spalte 19, Zeile 14 -Spalte 20, Zeile 55
Spalte 23, Zeile 52 -Spalte 24, Zeile 50
Abbildungen 1-5,26-36 | 4,7,10,
13 |
| Y | WO 86 06488 A (HICHEM DIAGNOSTICS INC DBA
BUR) 6. November 1986 (1986-11-06)
Seite 6, Absatz 1
Seite 6, Absatz 4
Seite 7, Absätze 2-4
Seite 10, Absatz 1
Seite 10, Absatz 3 -Seite 11, Zeile 8
Abbildungen 1-6 | 10,12 |
| P,A | EP 0 983 795 A (HITACHI SOFTWARE ENG)
8. März 2000 (2000-03-08)

Spalte 1, Zeile 56 -Spalte 2, Zeile 24
Spalte 3, Zeile 38 -Spalte 4, Zeile 30
Spalte 4, Zeile 47 -Spalte 4, Zeile 49
Spalte 5, Zeile 18 -Spalte 5, Zeile 48
Abbildungen 1-9 | 1-3,6,8,
9,11,12,
16 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu einer Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/JP 00/09808

| Im Recherchenbericht
angeführtes Patentdokument | Datum der
Veröffentlichung | Mitglied(er) der
Patentfamilie | Datum der
Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|---|--|
| US 4798706 A | 17-01-1989 | US 4731335 A
CA 1302969 A
DE 3630866 A
GB 2180647 A,B
JP 1804588 C
JP 5011857 B
JP 62098231 A
JP 1932910 C
JP 5240748 A
JP 6070603 B
US 4801431 A
US 4777020 A
US 5023187 A | 15-03-1988
09-06-1992
26-03-1987
01-04-1987
26-11-1993
16-02-1993
07-05-1987
26-05-1995
17-09-1993
07-09-1994
31-01-1989
11-10-1988
11-06-1991 |
| US 5738825 A | 14-04-1998 | DE 69420375 D
DE 69420375 T
EP 0660924 A
JP 8504955 T
WO 9503538 A | 07-10-1999
18-05-2000
05-07-1995
28-05-1996
02-02-1995 |
| US 5487872 A | 30-01-1996 | KEINE | |
| US 5681741 A | 28-10-1997 | US 5364790 A
US 5527510 A
US 5675700 A
AT 177024 T
AU 673397 B
AU 5505494 A
AU 705036 B
AU 6219496 A
CA 2106360 A
CN 1095759 A
DE 69323720 D
DE 69323720 T
DK 611598 T
EP 0611598 A
EP 0884394 A
IL 107131 A
IL 120847 A
JP 6245771 A
NZ 248835 A | 15-11-1994
18-06-1996
07-10-1997
15-03-1999
07-11-1996
18-08-1994
13-05-1999
21-11-1996
17-08-1994
30-11-1994
08-04-1999
01-07-1999
27-09-1999
24-08-1994
16-12-1998
30-09-1997
22-09-1999
06-09-1994
21-12-1995 |
| WO 8606488 A | 06-11-1986 | EP 0221105 A | 13-05-1987 |
| EP 0983795 A | 08-03-2000 | JP 2000078998 A
US 6071702 A | 21-03-2000
06-06-2000 |



11-11-11

11-11-11

11-11-11